

IDENTIFIZIERUNG VON AVIÄREN
MYKOPLASMEN MITTELS POLYACRYLAMIDGEL-
ELEKTROPHORESE

PAUL-HEINZ MÜLLEGGER

1972



8 München 23
Clemensstraße 27
Telefon 342149



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Krankheiten des Haus- und Wildge-
flügels der Ludwig Maximilians - Universität München

Vorstand: Professor Dr. I. G y l s t o r f f

I D E N T I F I Z I E R U N G V O N A V I Ä R E N
M Y K O P L A S M E N M I T T E L S P O L Y -
A C R Y L A M I D G E L - E L E K T R O P H O R E S E

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians
Universität München

von

Paul - Heinz M ü l l e g g e r
aus Augsburg

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck

Referent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Korreferent: Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 11. Februar 1972



MEINER LIEBEN FRAU
UND UNSEREN ELTERN
IN DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
LITERATUR	2
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
Versuchsansstellung	19
Material und Methoden	19
Vorversuche	31
Ergebnisse	33
DISKUSSION	56
ZUSAMMENFASSUNG	66
SUMMARY	67
LITERATURVERZEICHNIS	68

E I N L E I T U N G

Die Mykoplasmatales werden, genau wie andere Mikroorganismen durch eine Anzahl verschiedener biologischer Eigenschaften definiert und identifiziert. Morphologie, Ultrastruktur, Stoffwechselaktivität, Antigenstruktur, Wirtsspektrum sowie Pathogenität werden zur Klassifizierung herangezogen. Die relative Bedeutung einzelner Eigenschaften für die Zuordnung der Isolate zu bestimmten Spezies bzw. Genera variiert. Noch immer steht es nicht fest, welche Kombination von Eigenschaften im Einzelnen den Ausschlag zu geben hat (EDWARD und FREUNDT, 1969). Wegen der Schwierigkeit der morphologischen Beurteilung von primär pleomorphen Organismen und der Vielfältigkeit ihrer Stoffwechselreaktionen haben serologische Methoden zur Differenzierung von Mykoplasmen bisher den Vorrang gehabt. Doch erlaubt die Vielzahl serologisch unterschiedlicher Mykoplasmen - Stämme derzeit nicht einmal die schnelle Zuordnung aller pathogenen Vertreter zu bestimmten Mykoplasmen - Arten. Da nach der weitgehenden Tilgung von *M. gallisepticum* in den einheimischen Hühnerbeständen vermehrt pathogene Spezies beobachtet werden, die nicht als *M. gallisepticum* anzusprechen sind, ist für die Beurteilung ihrer Verbreitung und als Grundlage für Behandlungsprogramme ihre sichere und rasche Einordnung von ausschlaggebender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Polyacrylamid - Gel - Elektrophorese zur schnellen und sicheren Differenzierung aviärer Mykoplasmen - Stämme und Feldisolate eignet.

L I T E R A T U R

Gegenwärtig werden die Mykoplasmatales in zwei Familien eingeteilt:

- 1.) Acholeplasmataceae (cholesterol - unabhängig, unempfindlich gegenüber 5 %igem Polyanetholsulfonat)
- 2.) Mykoplasmataceae (cholesterolabhängig, empfindlich gegenüber 5 %igem Polyanetholsulfonat)(EDWARD und FREUNDT, 1970).

Beim Geflügel sind bisher außer *Acholeplasma laidlawii* nur Mykoplasmen - Stämme festgestellt worden (FABRIKANT, 1969). Die taxonomischen Einordnungsversuche an bereits definierten Spezies zeigen, daß es sich bei den einzelnen Arten um sehr unterschiedliche Typen handelt.

KLIENEGERGER-NOBEL(1962) wies bereits auf die morphologischen Besonderheiten von *M. gallisepticum* hin, die von DOMERMUTH et al. (1964) sowie von CHU und HORNE (1967) elektronenoptisch bestätigt wurden. Nach diesen Untersuchungen ist *M. gallisepticum* überwiegend coccoid. Filamente treten, im Gegensatz zu anderen Spezies, nur unter besonderen, jedoch noch nicht definierten Bedingungen auf. Die kleinsten vermehrungsfähigen Strukturelemente sind größer als die der anderen Vertreter der Familie. Die elektronenoptisch nachweisbaren Oberflächenstrukturen, die den Stacheln der Myxoviren ähneln und die Anordnung der Ribosomen in maiskolbenähnlichem Muster, sowie das Auftreten von deutlich ausgebildeten polaren Bläschen, wird ebenfalls nur bei dieser Spezies beschrieben. KENNY (1971) konnte weiterhin mit der doppelten Immunodiffusion zeigen, daß *M. gallisepticum*

keine antigene Verwandtschaft zu irgendeiner anderen Mykoplasmen - Spezies aufweist. Dies steht im Widerspruch zu der von ROBERTS und OLESIUK (1967) bei der Anwendung von Agglutination und Hämagglutinationshemmung (HAH) festgestellten Tatsache, daß *M. gallisepticum* und *M. synoviae* partiell kreuzantigen sind. Dies bedeutet, daß durch Antiserum gegen *M. synoviae* *M. gallisepticum* - Antigen agglutiniert wird. *M. gallinarum* wird von KENNY (1971) mit *M. hominis*, *M. salivarum*, *M. gateae* und *M. arginini* in einer serologisch recht einheitlichen Gruppe zusammengefaßt. Nach demselben Autor sind *M. synoviae* und *M. anatis* mit so unterschiedlichen Arten wie *M. bovigenitalium*, *M. canis*, *M. felis*, *M. hyorhinae*, *M. neurolyticum* u.a. antigenmäßig verwandt. Über andere aviäre Spezies wie *M. iners* und *M. meleagridis* stehen ähnliche Untersuchungen noch aus. Die Anwendung unterschiedlicher serologischer Untersuchungsmethoden führt bei weiteren aviären Stämmen zu widersprüchlichen Ergebnissen. So werden z.B. EDWARD'S PG - 30 - Stamm und der OZ - Stamm von ADLER, die von KLECKNER (1960), YODER und HOFSTAD (1964) und DIERKS et al. (1967) als Serotyp G bezeichnet wurden, heute *M. iners* genannt. Die Beziehung dieser Stämme zu Serotyp E ist jedoch nicht klar. Während FABRIKANT (1960) auf Grund von Kreuzagglutinations - Testen die Serotypen E und G als unterschiedlich betrachtete, sahen KELTON und VAN ROEKEL (1963) dieselben Stämme auf Grund von Wachstumshemmtesten als identisch an. DIERKS et al. (1967) haben anhand von Kreuzagglutinations - Testen 19 aviäre Serotypen beschrieben. Neuere Untersuchungen von BARBER und FABRIKANT (1971) mit dem Stoffwechselhemmtest zeigen jedoch, daß Stämme der Serotypen I, J, K, N, Q und R gemeinsame Antigenkomponenten haben, die - zusammen mit einer sehr einheitlichen biochemischen Reaktionsweise - eine Trennung in definierte Gruppen nicht erlaubt. Nach den gleichen Autoren sind auch Stämme von *M. gallinarum* und *M. anatis* antigenmäßig verwandt, während dies von KENNY (1971) mit der Immunodiffusion nicht nachgewiesen werden konnte.

BARBER und FABRIKANT (1971) zeigen mit dem Stoffwechselhemmtest weiter, daß Serotyp O mit C und Serotyp D mit P verwandt ist. Der Serotyp E wird nach diesem Schema als zu M. iners gehörig betrachtet. Auf der Basis des Stoffwechselhemmtestes können also nur 10 serologische Gruppen bei aviären Mykoplasmen unterschieden werden. Aus den angeführten Befunden läßt sich ableiten, daß die taxonomische Stellung der verschiedenen aviären Mykoplasmen -Stämme und Spezies auf der Grundlage der bisher benutzten Kriterien nicht möglich ist.

Die zur Stammdifferenzierung bisher verwendeten serologischen Untersuchungsmethoden bedienen sich einer Vielzahl von verschiedenen Antigen - Antikörper - Reaktionen. Frühe Untersuchungen mit der Röhrchenagglutination zeigten, daß Mykoplasmenzellen mit spezifischen Antiseren direkt agglutinierbar sind (KLIENEGER, 1938). So wurden Röhrchen- und Objektträgeragglutination auch zur Erkennung von Mykoplasmeninfektionen beim Geflügel angewandt. Es erwies sich, daß diese Methoden mit standardisiertem Antigen für Routineuntersuchungen auf *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* und *M. synoviae* brauchbar sind (ADLER, 1958; YAMAMOTO und ADLER, 1958). Allerdings eignet sich die Agglutination nur zur Herdendiagnostik, da vom infizierten Einzeltier Antikörper in Abhängigkeit vom Krankheitsgeschehen in sehr unterschiedlichem Maße gebildet werden. Solange eine Besiedlung der Schleimhäute mit Mykoplasmen ohne histologisch nachweisbare Gewebsveränderungen bleibt, ist ein Nachweis humoraler Antikörper in der Regel nicht möglich (GERLACH et al., 1968). Erst die intensive Auseinandersetzung des Organismus mit dem Erreger, vor allem nach intrazellulärer Vermehrung und Penetration durch die Epithelschicht, führt zur Ausbildung hoher Antikörpertiter (CORSTVET und SADLER, 1965). Der Erreger kann sich in Anwesenheit agglu-

tinierender Antikörper vermehren. Nach Eliminierung des Antigens aus dem Organismus sinkt der Antikörpertiter schnell ab, ohne daß eine belastbare Immunität nachweisbar ist. Da die Anwesenheit des Erregers im Einzeltier somit nur ungenügend angezeigt wird, ist die Tilgung einer Herdeninfektion auf Grund von Reagentenausmerzungen, wie sie z.B. bei *Salmonella pullorum* mit Erfolg angewendet wurde, nicht möglich (FABRIKANT, 1969).

Ein weiterer Faktor, der die Agglutination als Diagnostikmethode einschränkt, ist die nicht selten unbefriedigende Qualität des Antigens (Autoagglutination, ungenügende Empfindlichkeit). Mit experimentell hergestellten, spezifischen, monovalenten Seren können Antigene von Laborstämmen einer Mykoplasmen - Spezies bzw. eines Serotypes mittels der Agglutination erkannt werden. Die Spezifität der Reaktion wird jedoch nicht nur durch Autoagglutination und ungenügende Empfindlichkeit des Antigens - besonders von Feldstämmen - beeinflusst, sondern auch durch unspezifische Faktoren im Patientenserum (YODER und HOFSTAD, 1964). Hühner- und Putenserum reagieren z.B. nicht gleichmäßig schnell mit dem homologen Antigen (Huhn 2 Minuten, Pute 3 Minuten Ablesezeit) (ADLER, 1958). Außerdem treten nach ADLER und DA MASSA (1965), OLSON (1965), ROBERTS und OLESIUK (1967) Kreuzreaktionen mit anderen Serotypen auf, z.B. bei *M. gal-lisepticum* mit *M. synoviae*, mit Serotyp P und mit Bakterien - Antigen von *Erysipelothrix rhusiopathiae* und Staphylokokken. Die unterschiedliche Antigenität, die von diesen Autoren mehrfach festgestellt wird, ist nirgends eindeutig definiert. Sie bezieht sich im wesentlichen auf Eigenschaften der Antigenstämme, die eine gleichmäßige und regelmäßige Agglutination nur unter bestimmten Voraussetzungen erlauben. Einige dieser Voraussetzungen sind gute Anpassung an das Kulturmedium und geringe Tendenz zur Autoagglu-

tionation. Es muß weiter als Tatsache hingenommen werden, daß Antigene verschiedener Stämme bei gleicher Kulturmethode und gleicher Dichte mit ein und dem selben Serum verschiedene Titerhöhen anzeigen. Die bereits mehrfach erwähnte Autoagglutination, die von SCHIMMEL und HUBRIG (1968) bei Schweineisolaten beschrieben wird, ist als besondere Stammeseigenschaft zu betrachten. Sie tritt bei *M. gallisepticum* auf und gehäuft dann, wenn das Antigen erst nach Ablauf der logarithmischen Wachstumsphase gewonnen wurde.

Die Antiglobulintechnik (ADLER et al., 1964) ist zwar empfindlicher und genauer als die direkte Agglutination, findet jedoch wegen des erforderlichen Zeitaufwandes nur als Zusatzuntersuchung Verwendung. Für praktische Belange könnte die Agglutination - besonders die Objektträgerschnellagglutination - noch abgesichert werden, indem eine Standardisierung bezüglich der zu benutzenden Stämme, ihrer Keimdichte und Membraneigenschaften durchgeführt wird. Versuche in dieser Richtung wurden bereits unternommen (LAWSON und HERTLER, 1969).

Da einige Mykoplasmenspezies die Fähigkeit haben, Erythrozyten zu agglutinieren, wird die Hämagglutination und Hämagglutinations - Hemmung meist als Untermauerung der Agglutinationsergebnisse herangezogen. Bei den aviären Mykoplasmen ist bisher bei Stämmen der Serotypen A, H, I, J, K und *M. anatis* das - wenn auch nicht regelmäßige - Vorkommen von Hämagglutininen beschrieben worden (YODER und HOFSTAD, 1964; RHOADES, 1969). Jedoch nur bei Serotyp A wurde unter Verwendung geeigneter Antigenstämmen die HAH für die routinemäßige Anwendung ausgearbeitet. Sie stellt zur Zeit die wichtigste Kontrollmethode zur Erstellung und Erhaltung *M. gallisepticum*freier Geflügelherden dar (FAHEY

und CRAWLEY, 1954; CRAWLEY und FAHEY, 1955; JUNGHERR et al., 1955). Die bei der Agglutination beobachteten störenden Kreuzreaktionen mit anderen Serotypen und vor allem mit verschiedenen Bakterienantigenen treten bei der HAH nicht auf. BAHARSEFAT und ADLER (1965) gelang es durch Formalinbehandlung des Antigens und durch Konservierung der Erythrozyten die Haltbarkeit dieser Reagenten zu verlängern. Seit der Entdeckung eines hämagglutinierenden *M. meleagridis* - Stammes durch RHOADES (1969) wird die HAH auch für die Diagnostik dieser Spezies verwendet.

Die direkte Komplementbindungs - Reaktion (KBR), die von CAMPBELL und TURNER (1936) für *M. mycoides* var. *mycoides* ausgearbeitet wurde und für *M. pneumoniae* die Methode der Wahl ist (CHANOCK et al., 1936; JANSSEN et al., 1964; GRAYSTONE et al., 1965), kann bei Huhn und Pute, sowie bei vielen anderen Vogelarten nicht angewandt werden. Hitzeinaktiviertes Antiserum verschiedener Vogelarten fixiert den Meerschweinchen - Komplement - Faktor C1 in der üblichen direkten KBR nicht. Ein direkter Komplementbindungstest mit nicht inaktiviertem Geflügelserum hat sich als unpraktisch erwiesen, da diese Seren hochgradig antikomplementär wirken (BUSHNELL, 1927; RICE, 1947). Es wurden daraufhin Versuche mit der indirekten KBR vor allem von RICE (1948) durchgeführt. Diese Methode erwies sich jedoch als so umständlich, daß sie keine Verbreitung gefunden hat. Außerdem benötigt man dazu ein passendes Säugetier - Indikator - Antiserum, das meist selbst hergestellt werden muß. BRUMFIELD und POMEROY (1967) entwickelten einen direkten KBR - Test mit nicht erhitztem Serum und einem Überschuß von C1, um die antikomplementäre Wirkung der nicht inaktivierten Seren zu neutralisieren. Später benutzten sie einen direkten KBR - Test, bei dem unerhitztes Puten- oder Hühner Serum als "Implement" zugeführt wurde. Das "Implement" (d.h. natives Puten-

oder Hühnerserum zu inaktivierten Testseren) enthält einen hypothetischen, essentiellen, hitzelabilen Faktor S, der eine Komponente von C1 sein soll und der die existierende Inkompatibilität zwischen Meerschweinchen - C1 und den verschiedenen aviären Antigen - Antikörper - Komplexen ausschaltet. Der Faktor erlaubt eine Fixierung der verbleibenden Komponenten von Meerschweinchen - C1 (BENSON et al., 1961). Auf dieser Basis kann auch beim Geflügel eine direkte KBR durchgeführt werden. Erste Ergebnisse mit *M. gallisepticum* und *M. synoviae* liegen vor (MARQUARDT und NEWMAN, 1970). Es wurde eine geringe Kreuzreaktivität zwischen den beiden Spezies festgestellt. Empfindlichkeit und Spezifität werden als dem HAH - Test überlegen beurteilt.

Um die verschiedenen Antigenkomponenten, die mit anderen serologischen Methoden nicht erfassbar sind, aufzutrennen, wurde, besonders in der Humanmedizin, die Agar - Gel - Diffusion angewandt (LEMCHE, 1965; TAYLOR - ROBINSON, 1963 u. 1965). Die Ergebnisse deuteten die Brauchbarkeit der Methode an, und es konnten bei den verschiedensten Stämmen - unter anderem auch bei Geflügelmykoplasmen - gemeinsame Komponenten nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden spezifische Präzipitationslinien gesehen, die bestimmten Stämmen eigen sind. SHIMIZU und SATO (1970) benutzten eine Doppel - Diffusions - Technik mit *M. gallisepticum* in dieser Fragestellung. Das Auftreten von Präzipitationslinien bei Benutzung eines Stammes und desselben Antiserums erwies sich als nicht eindeutig reproduzierbar und war abhängig von der Proteinkonzentration des Antigens und dem Zeitpunkt der Serumentnahme nach der Immunisierung. So wurden z.B. bei 0,1 mg/ ml Protein im Antigen 4 Präzipitationsbanden, bei 2 - 4facher Verdünnung des Antigens 1 - 2 Linien und bei 16 - 32facher Verdünnung nur noch eine Linie gesehen. Das Immunserum, gewonnen nach 3 Wochen, gab 3 Linien und nach

6 Wochen 5 Linien. Wurden mehrere Stämme nach Standardisierung der Technik verglichen, so wurden 2 - 5 Präzipitationslinien gesehen. Im Kreuztest ließen sich bei 3 Stämmen 3 gemeinsame Antigenkomponenten ersehen. Bei 2 Stämmen zeigten sich dagegen 4 gemeinsame Linien. Diese Untersuchungen zeigen, daß zumindest die Spezies *M. gallisepticum* auch bezüglich der Präzipitinogene variiert und der Wirt zu sehr unterschiedlich starker Bildung von Antikörperkomponenten Anlaß gibt. Die Technik erscheint daher für praktische Zwecke wenig brauchbar.

Mittels fluoreszenzserologischer Methoden können Mykoplasmen qualitativ sicher diagnostiziert werden (MALIZIA et al., 1961; BARILE et al., 1961 u. 1962; NOEL et al., 1964; CORSTVET, 1965). Die Methode wird hauptsächlich in der Humanmedizin und bei der Diagnostik von Säugermycoplasmen benutzt. Es eignet sich besonders die direkte Fluoreszenz mit markiertem Antiserum zur Untersuchung von Kulturpräparaten, die entweder auf dem Objektträger selbst gewachsen oder als Abklatschpräparat von Kulturplatten angelegt worden sind (BAUDITZ und HINZ, 1968). Bei Verwendung von Gewebe oder Gewebekulturmateriel muß die Ausschaltung unspezifischer Fluoreszenz durch Absättigung mit Gewebeextrakten erreicht werden (CORSTVET, 1965). Unter diesen Voraussetzungen wird der direkten Fluoreszenzserologie aviärer Mykoplasmen - Stämme eine hohe Spezifität nachgesagt (YAMAMOTO und ORTMAYER, 1971). Größere Erfahrungen liegen bisher nach CORSTVET und SADLER (1965) und ADLER und ORTMAYER (1971) nur mit der Identifikation von *M. gallisepticum* vor. Letztere können auch *M. meleagridis* sehr sicher von anderen Spezies oder Stämmen mit dieser Methode unterscheiden. Untersuchungen mit anderen Serotypen stehen noch aus.

Eine weitere serologische Untersuchungsart ist der Wachstums - Hemmtest (GI). Seit ELWAED und FITZGERALD (1954) über die Wachstums hemmung von Mykoplasmen durch Zusatz von Antiserum zum Nährmedium berichteten, wurde der Test vielseitig angewandt (FABRIKANT, 1960; KELTON und VAN ROEKEL, 1963; CLYDE, 1964). Er wurde von STAINERIDGE und HAYFLICK (1967) modifiziert, indem sie Plättchen, die mit Antiserum getränkt waren, auf die Agaroberfläche brachten. Das Auftreten von Hemmzonen um die Plättchen wird als positiv angesehen. In dieser vereinfachten Form ist der GI - Test die Grundlage für die Identifizierung von Mykoplasmen aus Mensch und Säugetieren. Seiner Verwendung bei der Klassifizierung aviärer Stämme steht entgegen, daß GI nur bei der Benützung von Hochimmunsereen auftritt. Da diese Seren wegen der gleichzeitig entstehenden Gewebsantikörper nur im autologen System erzeugt werden können, ist diese Methode nicht praktikabel. (KELTON und VAN ROEKEL, 1963; SABRY, 1968). Der GI - Test führt, wie bereits vorne erwähnt (Seite 3 u. 4), in einigen Fällen zu anderen Ergebnissen als die Agglutination (FABRIKANT, 1960; KELTON und VAN ROEKEL, 1963).

Der von PURCELL et al. (1967) ausgearbeitete Stoffwechsel-Hemmtest stellt eine weitere Differenzierungsmethode dar. Während humane und Säugerstämme nach der inzwischen umfangreichen Literatur (HAYFLICK, 1969) mit diesem Test recht gut unterschieden werden können, gibt es bei den aviären Stämmen erhebliche Interpretationsschwierigkeiten. Wie FRIEDRICH (1970) zeigte, ist eine Spezifität nur bei Verwendung von Gammglobulin gegeben. Er konnte außerdem nachweisen, daß Feldstämme, die noch nicht weitgehend an das Wachstumsmedium adaptiert sind, ihnen normalerweise eigene Eigenschaften wie Kohlehydratabbau und Reduktion von Tetrazoliumchlorid unter solchen Umständen noch nicht zeigen. Zusätzlich konnte das unregelmäßige Auftreten von Hemmfaktoren im Serum infizierter und nicht infizierter

Tiere gezeigt werden. Deren Wirkung war von der spezifischer Antikörper nicht zu unterscheiden.

Andere Differenzierungsmethoden der Mikrobiologie als serologische wurden bisher nur spärlich auf dem Gebiet der Mykoplasmen angewandt.

Im Mikroskop zeigen verschiedene aviäre Mykoplasmen-spezies Unterschiede in Gestalt und Größe von Kolonie und Einzelorganismus. YAMAMOTO und ADLER (1958) sowie KLECKNER (1960) teilen die aviären Mykoplasmen anhand der Koloniegroße in 2 Gruppen ein. Die Serotypen A, H, I, J, bilden auf festem Medium relativ kleine (0,1 mm nach 48 Stunden), die anderen relativ große Kolonien (0,2 - 0,4 mm nach 48 Stunden). Nach den Beobachtungen im hiesigen Institut zeigt der Serotyp A - *M. gallisepticum* auf ADLER'S PPLO - Medium eine typische Kolo-niepleomorphie. Diese hat sich als sehr wertvolles Merk-mal für die Erkennung dieses Serotyps erwiesen. Es wur-de ferner festgestellt, daß Mykoplasmen - Stämme des Huhnes, die auf der Oberfläche steroidhaltiger Platten und Röhrchen Kristallformen bilden, niemals *M. galli-septicum* sind und sich bisher noch in keinem Fall ex-perimentell als pathogen erwiesen haben. Dagegen zeigen die meisten einheimischen Taubenstämme die erwähnte Kristallbildung.

An Einzelorganismen werden von YAMAMOTO und ADLER (1958); KLECKNER (1960) und von YODER und HOFSTAD (1964) coc-coide und stäbchenförmige, ringförmige sowie fädig-ver-zweigte Zellformen beschrieben. Obwohl Flüssigkul-turen eines Stammes mehrere dieser Formen gleichzeitig

aufweiser können, hat sich die bereits 1958 von YAMAMOTO und ADLER geäußerte Auffassung bestätigt, daß in ein und dem selben Medium von ein und dem selben Isolat überwiegend eine Form gebildet wird. Fädig-verzweigte Formen, sog. Filamente, sind bei aviären Mykoplasmen extrem selten und wenn sie auftreten, sind sie nur in einer ganz frühen Wachstumsphase zu beobachten (RAZIN et al., 1967).

Biochemische Eigenschaften wie Kohlehydratvergärung und die Reduktion von Tetrazolium stellen wertvolle zusätzliche Charakteristika dar. Es wurden im Falle der aviären Mykoplasmen nur wenige Reaktionen getestet. Diese Reaktionsmuster treten aber bei verschiedenen Spezies und Serotypen so gleichgerichtet auf, daß durch sie allein eine Typenunterscheidung nicht möglich wird. Ihr Auftreten ist aber andererseits sehr regelmäßig und, im Gegensatz zu Bakterien, bisher ohne Ausnahme (FABRIKANT, 1969). Einschränkungen sind hierbei insofern zu machen, daß nicht voll ans Medium adaptierte Stämme trotz guter Vermehrung ihre Stoffwechseleigenschaften noch nicht voll zeigen (FRIEDRICH, 1970).

Vergleichende Untersuchungen über das Basenverhältnis in der genetischen Substanz der Mykoplasmen wurden in letzter Zeit von mehreren Autoren durchgeführt (WALKER, 1967; BAK, 1968; KELTON und MANDEL, 1969). Diese Methode hat sich als sehr spezifisch für die Charakterisierung von Mikroorganismen - Stämmen auf der Genusebene erwiesen und gilt heute, zusammen mit der Größe des genetischen Materials, als sicherstes taxonomisches Merkmal. Die praktische Anwendung ist jedoch auf einige Speziallabors beschränkt. Diese Methode wurde bisher bei *M. gallinarum*, *M. gallisepticum* und *M. anatis* angewandt (SOMERSON und

WEISSMAN, 1969; KENNY, 1971). *M. gallinarum* zeigte ein Guanin : Cytosin - Verhältnis von 27,5 - 28,1, *M. gallisepticum* eines von 32,0 - 34,0 und *M. anatis* eines von 30,0 - 32,0 (KELTON und MANDEL, 1969).

Die Pathogenität der einzelnen Serotypen für die verschiedenen Geflügelarten wurde von YODER und HOFSTAD (1964) und von DIERKS et al., (1967) ausführlich untersucht. Sie fanden, daß die unterschiedlichen Vogelspezies auf die Infektion mit dem selben Isolat verschieden reagieren. So zeigte sich, daß z.B. bei Inokulation mit Serotyp A bei Hühnerküken hauptsächlich Veränderungen an Trachea, Luftsäcken, Sprunggelenken und Fußballen auftraten, während bei Puten stärkere Allgemeinerscheinungen und eine Sinusitis im Vordergrund standen. Bei Tauben traten keine Krankheitserscheinungen auf, aber es wurden Antikörper gebildet. Bei Wachteln konnten durch *M. gallisepticum* - Isolate weder Symptome noch eine Antikörperbildung ausgelöst werden. *M. meleagridis* ist für Hühner apathogen, während es bei Puten zu einer milden respiratorischen Erkrankung kommt, die sich hauptsächlich an den Luftsäcken manifestiert. Einige Isolate der Serogruppe I, J,K,N,Q,R sollen nach DIERKS (1967) eine milde Luftsackentzündung bei Eintagsputen bewirken können. FABRIKANT (1970) berichtete über die weite Verbreitung des Serotyps I in Puten und nicht selten auch in Hühnern. Aerosacculitis war besonders bei, beim Schlupf steckengebliebenen Embryonen oder bei Eintagsküken nachweisbar. Der Serotyp L von YODER, der offensichtlich der einzige in der Literatur beschriebene Taubenstamm ist, wurde noch nicht auf Pathogenität getestet. Die ebenfalls nur als ein Stamm bekannte Spezies *M. anatis* wird von ROBERTS (1964) als apathogen bezeichnet. HAH - Antikörper treten nicht auf, Agglutinine können jedoch nachgewiesen werden. Erst nach einer

zusätzlichen Infektion mit Influenza - Virus treten typische, pathologisch - anatomische Erscheinungen von seiten des Respirationstraktes auf, die von der Ausbildung hämagglutinations-hemmender Antikörper begleitet werden. Die wechselnde Pathogenität verschiedener aviärer Mykoplasmen - Stämme in mehreren Vogelarten erlaubt es nicht, diese Eigenschaft ausschließlich für die taxonomische Zuordnung heranzuziehen. Sie ist aber im Zusammenhang mit anderen Untersuchungsergebnissen ein wertvolles Hilfsmittel.

Da es bis heute keine Untersuchungsmethode gibt, Mykoplasmen schnell, sicher und ohne großen Aufwand zu differenzieren, wird nach weiteren brauchbaren Techniken gesucht. So wurde auch die Elektrophorese zu diesem Zweck eingesetzt. Die Stärkegel - Elektrophorese wurde von SMITHIES (1955) eingeführt und bald weiter ausgebaut (POULIK, 1957; SMITHIES, 1959; PERT et al., 1959). In diesen Arbeiten zeigte sich, daß Stärkegel als Elektrophoreseträger besser geeignet ist als flüssige, granuläre oder feste Medien. Da es sich bei Stärke jedoch um ein Naturprodukt handelt, ist ihre gleichbleibende Qualität nicht gewährleistet. Zudem wirken die natürlich vorhandenen Ionen bei elektrophoretischen Untersuchungen störend. So konnte sich Stärke als Trägersubstanz für vergleichende Untersuchungen nicht durchsetzen. Sie wurde von Polyacrylamid - Gel abgelöst. Die Polyacrylamid - Gel - Elektrophorese (PAA-G-E) wurde erstmals von RAIMOND und WEINTRAUB (1959) beschrieben. Es handelt sich bei diesem Gel um ein Polymerisationsprodukt von Acrylsäureamid und einem Vernetzer, meist Methylenbisacrylsäureamid. Die Nachteile, die Naturstoffe wie Stärke oder Agar mit sich bringen, fallen weg, da synthetische Produkte immer in der gleichen Beschaffenheit herstellbar sind. In Form der Disk - Elektrophorese (DAVIS, 1964) findet das PAA-Gel in vielen Bereichen der Forschung Ver-

wendung. Diese analytische Mikromethode, mit deren Hilfe Polyelektrolyte mit Molekulargewichten von mehr als 10^4 zu trennen sind, zeichnet sich besonders durch gute Reproduzierbarkeit und hohes Auflösungsvermögen aus. Weitere Vorteile sind chemische Stabilität gegenüber pH- und Temperaturänderungen, Steuerbarkeit der Struktur (Porengröße des "Trennsiebes" ist von der Substanzkonzentration abhängig), Transparenz des Gels und verhältnismäßig geringer apparativer Aufwand. Die Disk - Elektrophorese ist besonders gut brauchbar für die Trennung von Proteinen, Proteiden, Polypeptiden und Nukleinsäuren. So lag es nahe, diese Methode auch in der Mikrobiologie anzuwenden (MAURER, 1968).

Erstmals untersuchten FOWLER et al. (1963) Mykoplasmen durch elektrophoretische Auftrennung. Allerdings benutzten sie noch Stärke als Trägermedium. Ihre Untersuchungen erstreckten sich auf 9 Mykoplasmen - Stämme, teils aviäre, teils humane, und auf L-Formen zweier Bakterien-spezies. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß einige Mykoplasmen auf Grund ihrer Proteinstruktur unterschieden werden können. Die Autoren weisen darauf hin, daß diese Ergebnisse mit Stämmen erreicht wurden, die durch zahllose Passagen unter bestimmten Bedingungen an das Nährmedium adaptiert worden waren. Es traten im Pherogramm des Gels 6 - 12 Eiweißbanden auf. Die relative Wanderungsgeschwindigkeit wurde auf die Pufferfront bezogen berechnet. Untersuchungen von Mykoplasmen im PAA-G führten als erste ROTTEM und RAZIN (1967) und FOWLER et al. (1967) durch. Derartigen Versuchen lag die Überlegung zugrunde, daß die Zusammensetzung der Membran eines Mikroorganismus genetisch bedingt ist. Es müßte also möglich sein, verschiedene Spezies an der Struktur ihrer Membran zu identifizieren. In früheren Experimenten hatte sich erwiesen, daß die Membran, welche die Mykoplasmen - Zelle umgibt, zu 50 - 60 %

aus Proteinen und zu 30 - 40 % aus Lipiden besteht (RAZIN et al., 1963). Folglich wurden die Eiweiße von den anderen Membransubstanzen getrennt, in Natrium - dodecyl - sulfat gelöst und im basischen PAA-G nach DAVIS (1964) lauffengelassen. Das Eiweiß wanderte als eine einzige breite Bande, womit nicht viel anzufangen war. Als dann nach der Methode von TAKAYAMA et al. (1966) das Protein der Membranen in Phenol - Essigsäure - Wasser gelöst wurde und in einem Gel-system, das 35 % Essigsäure und 5 M Harnstoff enthielt, untersucht wurde, zeigten sich 10 verschiedene Proteinbanden. Die Essigsäure und der Harnstoff bewirkten, daß die hydrophoben Membranproteide monomer blieben und sich auch während des Elektrophoreselaufes nicht mehr zusammenschlossen. Außerdem ist die Wahl eines sauren Systems zur Darstellung möglichst vieler Fraktionen vorteilhaft, da die Mehrzahl der Mykoplasmen - Eiweiße, zumindest die von *M. gallisepticum* basischen Charakter haben (KIRK, 1969). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen ergab sich, daß die Banden von verschiedenen untersuchten Spezies gut reproduzierbar und bei nahe verwandten Stämmen sehr ähnlich und bei weniger verwandten recht unterschiedlich waren. Auch traten keine wesentlichen Differenzen zwischen unterschiedlichen Vermehrungschargen des selben Organismus auf. Da die PAA-G-E somit als Identifizierungsmethode für Mykoplasmen recht brauchbar erschien, wurde in dieser Richtung weitergearbeitet. Anstelle der Membranen, deren Isolierung schwierig und zeitraubend ist, wurden ganze Zellen der Elektrophorese unterzogen (RAZIN und ROTTEM, 1967). Man kam mit einer wesentlich kleineren Menge Organismen aus, und die verschiedenen Stämme waren anhand der Banden genauso gut zu unterscheiden. Änderungen in Konzentration oder Art des Serums im Wachstumsmedium der Mykoplasmen veränderten die charakteristischen Banden nicht. Ebenso nahm das Alter der Zellen keinen Einfluß.

Taxonomische Studien über Mykoplasmen mittels der PAA-G-E wurden von RAZIN (1968) beschrieben. Die aviären Stämme *M. gallisepticum*, *M. meleagridis*, *M. synoviae*, *M. gallinarum* und *M. iners* ergaben leicht unterscheidbare und spezifische Banden. So erscheint ihre Klassifizierung in verschiedene Spezies auch mit dieser Methode gerechtfertigt. Die Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Isolate von *M. hominis* sprechen dafür, diese Spezies zu unterteilen, da, wie auch im Stoffwechsel - Hemmtest, starke Verschiedenartigkeit deutlich wird. SACKS (1969) vergleicht mit der PAA-G-E nach RAZIN und ROTTEM (1967) 84 Enterobakteriaceen - Stämme sowie Staphylokokken - und Pseudomonas - Spezies und kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, daß diese Methode für die Feststellung genetischer Verwandtschaft zu taxonomischen Zwecken geeignet ist.

In den bisher erwähnten Arbeiten erfolgt die Auswertung der Elektrophorese durch direkten Vergleich der im Gel aufgetretenen und angefärbten Banden. Die Transparenz des PAA-G ermöglicht es, die Banden mit Hilfe von Photometer und angeschlossenem Schreiber aufzuzeichnen. So können Gele objektiver ausgewertet werden. Besonders sehr feine oder eng zusammenliegende Banden werden auch dann noch deutlich aufgezeichnet, wenn sie das menschliche Auge nicht mehr genau wahrnehmen kann. Die neueren Arbeiten, in denen Bakterien, L - Formen und Mykoplasmen mit der Disk - Elektrophorese untersucht werden, bedienen sich dieser Hilfe. THEODORE et al (1969) identifizieren so L - Formen von Proteus, Streptobazillen, Staphylokokken und Streptokokken im PAA-G. Sie halten die Methode für geeignet, die verschiedenen Genera zu unterscheiden und im Vergleich mit vorhandenen Referenzstämmen zu identifizieren. Es zeigt sich weiter, daß sich die L - Form eines Bakteriums von der Normalform im Gel kaum unterscheidet.

(KING et al., 1969). Somit ergibt sich die Möglichkeit L - Formen, die bakteriologisch oft recht schwierig zu identifizieren sind, durch direkten Vergleich bereits typisierten Normalformen zuzuordnen (KING et al., 1969; THEODORE et al., 1970). Von THEODORE et al. (1970) wird auch an 18 Mykoplasmen - Spezies verschiedener Tierarten die Möglichkeit untersucht, die PAA-G-E zur Identifizierung zu verwenden. Die Methode erweist sich als brauchbar. Vorauszusetzen ist, daß jeweils das selbe Gelsystem benutzt wird. Nur dann können die auftretenden Banden verglichen werden. Es wird von den oben genannten Autoren auch darauf hingewiesen, daß einfache Anwendung, hohe Reproduzierbarkeit und Unabhängigkeit vom Serum des Wachstumsmediums die Untersuchungsmethode auszeichnen. In den elektrophoretischen Untersuchungen von BRÜCKLER und BLOBEL, (1970) an Staphylokokken und deren Toxinen wird zur Fixierung der im Gel erscheinenden Banden die Berechnung ihrer relativen Wanderungsgeschwindigkeit (R-Wert) zu Hilfe genommen. Als Anhaltspunkt für diese Bestimmung, die eine weitere Verbesserung der Methode in Hinsicht auf die Genauigkeit darstellt, diente die im Gel am weitesten gewanderte Eiweißfraktion. Sie erschien als deutliche Zacke im Pherogramm und bildete R-100. So konnten die verschiedenen Banden objektiv bezeichnet werden.

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

V E R S U C H S A N S T E L L U N G

Es wurden 45 Mykoplasmenstämme, davon 14 Referenzstämme und 31 Feldstämme, deren Eigenschaften festlagen bzw. durch entsprechende Laboruntersuchungen ermittelt wurden, mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese untersucht. Anhand der relativen Wanderungsgeschwindigkeit der Mykoplasmenproteine im Gel und der auftretenden Eigenschaften im Pherogramm wurden die untersuchten Stämme in Gruppen geordnet. Die Ergebnisse aus der elektrophoretischen Untersuchung wurden mit der, auf konventionelle Art gestellten Spezialdiagnose verglichen.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Tabelle 1 (s. Abschn. Ergebnisse) gibt eine Übersicht über die Herkunft der verwendeten Referenzstämme und Feldisolate. Die dort angegebenen Eigenschaften der einzelnen Stämme wurden mit den nachstehend aufgeführten Methoden bestimmt bzw. bei Referenzstämmen überprüft.

Für alle Kulturen fanden folgende Nährböden nach ADLER (1954) einzeln oder in Kombination Verwendung:

ADLERS PPLO - Agar

Difco PPLO - Agar laut Gebrauchsanweisung

Hefeautolysat 55,0 ml/l

Thalliumacetat 1 : 2000

Autoklavieren bei 134,0° C, 20 min.

Nach Abkühlen auf 56°C, Zugabe von Penicillin (1000,0 I.E. /ml) und sterilem, inaktiviertem Pferdeserum (100,0 ml/l).

Der pH - Wert des fertigen Mediums 7,6 - 7,8.

ADLERS PPLO - Broth

Difco PPLO - Broth w/o CV laut Gebrauchsanweisung. Gleiche Zusätze und Bereitung wie PPLO - Agar (s.o.).

ADLERS - Overlay Medium

2 - 3 ml PPLO - Agar in schrägstehendes Reagenzglas. Nach Erkalten Überschichten mit PPLO - Broth.

Züchtung der Stämme

Die Referenzstämme wurden in Abständen von 8 - 10 Tagen auf Overlay - Broth passagiert. Die Gewinnung der Feld-isolate erfolgte über Tupferproben, die meist den Luftsäcken von frisch getöteten Tieren entnommen wurden. Die Anzüchtung aus diesen Proben geschah ebenfalls auf Overlay - Broth. Dann wurde auf Platten in einer feuchten

Kammer weiterbebrütet. Gleichzeitig wurde jeweils eine Blindpassage vorgenommen. Die Kolonien wurden unter dem Mikroskop begutachtet und dann durch Ausschneiden von bewachsenen Agarblöckchen zur weiteren Kultivierung in Overlay - Röhrchen verbracht. Nach 5 - 10 Anpassungspassagen an das Medium wurden die Stämme erneut auf Platten gegeben, dann Einzelkolonien isoliert und in Overlay - Broth weitergezüchtet. In Zweifelsfällen bezüglich der Reinheit der Kultur erfolgte eine Endpunkttitration. Die Stämme wurden in der im folgenden aufgeführten Weise charakterisiert.

Morphologie und biochemische Eigenschaften

Die Untersuchung erfolgte anhand folgender Punkte:

1. Morphologie der Kolonien auf PPLO - Platten unter dem Lichtmikroskop.
2. Morphologie der Einzelorganismen aus Flüssigkultur nach Bouin - Fixierung und Giemsa - Färbung.
3. Ermittlungen der biochemischen Eigenschaften in Röhrchen, die folgende Reagenzien enthielten:
 - a. PPLO - Broth + 0,5 % Glucose + Phenolrot 1 : 10 000
 - b. PPLO - Broth + 0,5 % Maltose + Phenolrot 1 : 10 000
 - c. 2,3,5, Triphenyltetrazoliumchlorid 1 : 3 000 (TTC)
 - d. PPLO - Broth ohne Zusatz (Wachstumskontrolle)
 - e. PPLO - Broth + 1,0 % Arginin + Phenolrot 1 : 10 000

Mit der Flüssigphase jedes Stammes wurden die Röhrchen a. - d. beimpft und 10 Tage lang die Fermentationsaktivität bzw. Reduktion, angezeigt durch Farbumschlag, beobachtet. Stämme, die zwar Wachstum in Röhrchen d. zeigten,

aber keinerlei Reaktion in Röhren a. - c. bewirkt hatten, wurden zur Wachstumskontrolle wieder auf PPLO - Platten gebracht. In Broth mit Argininzusatz wurden nur die Stämme F, CNG, TU, 1595/71, 830/71, 831/71, 832/71, 834/71 und 705/71 auf ihre Fähigkeit Arginindecarboxylase zu bilden untersucht.

Serologische Untersuchungen

Alle Feldisolate aus Hühnern wurden einer serologischen Untersuchung unterzogen. Dazu diente Antiserum gegen den *M. gallispticum* - Stamm S₆208. Hauptsächlich wurde die Objektträger - Schnellagglutination angewandt. In manchen Fällen fand die Langsamagglutination Verwendung. Bei ham-agglutinierenden Stämmen wurde zusätzlich mit dem Häm-agglutinations - Hemmtest gearbeitet.

Antigenherstellung

Das Antigen wurde nach ADLER und DA MASSA (1965) hergestellt. Log-phase Kulturen wurden in Abständen von 2 - 3 Tagen passagiert und im Verhältnis 1 : 10 in Flüssigmedium inokuliert. Die Überimpfung dieser Kulturen erfolgte dann nach 2, höchstens 3 Tagen und wieder in die 10fache Menge Broth. Mit diesem Vermehrungsmodus fuhr man fort, bis die für die Antigengewinnung erwünschte Endmenge erreicht war. Nach jeder Vermehrungsstufe wurde die Reinheit der Kultur geprüft und die Keimdichte geschätzt. Das Antigen wurde durch Abzentrifugieren der Flüssigkeit bei ca. 20 000 x g geerntet. Nach mehrmaliger Waschung in phys. NaCl wurde das Sediment in Sörensen-puffer pH 6,8 resuspendiert, auf Glasperlen homogenisiert und durch Gaze filtriert. Je nach Verwendungszweck er-

folgte Einstellen der Antigendichte und Konservieren mit Merthiolat (1 : 10 000). Für die serologischen Untersuchungen wurde das Antigen nach Vorverdünnung von 1 : 10 im Photometer bei 650 nm auf 0,25 % optischer Dichte, was 50 % Transmission entspricht, eingestellt. Die so gewonnenen Antigene begutachtete man auf Autoagglutination im Mikroskop. Bei vielen Feldstämmen war auch nach 10 und mehr Anpassungspassagen die Agglutinatbildung so stark, daß die Antigene für serologische Untersuchungen nur bedingt oder garnicht brauchbar waren. Antigene für die Herstellung von Immunsereen wurden so hoch konzentriert wie möglich gewonnen und nicht mit Merthiolat behandelt.

Herstellen von Antiseren

Die Antiseren wurden nach folgender Methode in Anlehnung an ADLER (1958) und ROBERTS (1969) gewonnen. Eintagsküken, die aus der institutseigenen SP-freien Herde stammten, erhielten je 0,2 ml Antigen in einen thorakalen Luftsack injiziert. Die Tiere wurden isoliert in Batterien 3 - 6 Wochen lang gehalten, dann entblutet und die Titerhöhe des Serums bestimmt. Die Lagerung der Seren erfolgte bei - 25,0°C. Dabei traten teilweise erhebliche Titerabfälle auf (BOX, 1968). Außerdem waren nach dem Auftauen regelmäßig Kälteagglutinate im Serum vorhanden. Diese mußten vor Gebrauch durch Zentrifugieren entfernt und der Titer neu bestimmt werden. Es wurden nur monovalente Seren gegen *M. gallisepticum* hergestellt.

Durchführung der serologischen Untersuchung

1. Objektträger - Schnellagglutination (n.ADLER, 1958)

Auf fettfreien Objektträgern wurde je 1 Tropfen Antigen und Antiserum vermischt. Die Reaktion erfolgte unter leichten Drehbewegungen des Objektträgers. Die Ablesezeit, die bei Hühnerseren 2 Minuten beträgt, wurde streng eingehalten. Zusätzlich erfolgte zur Prüfung auf Autoagglutination jeweils eine Serumkontrolle und eine Antigenkontrolle in physiologischer Kochsalzlösung. Stark lipoidhaltige Seren mußten vor Gebrauch mit Chloroform gereinigt werden.

2. Langsamagglutination (YODER und HOFSTAD, 1964)

Wenn die Schnellagglutination undeutliche Ergebnisse brachte oder hierbei die Antigene Autoagglutination zeigten, wurde eine Langsamagglutination durchgeführt. Antigen, 1 : 10 verdünnt, wurde gegen eine 2er logarithmische Reihe von Standardseren titriert. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 37,0°C im Brutschrank inkubiert und dann über Nacht im Kühlschrank belassen. Am nächsten Morgen konnte nach Erwärmen auf Zimmertemperatur abgelesen werden. Zur Kontrolle wurde eine Serumverdünnung in NaCl mitgeführt.

3. Hämagglutination und Hämagglutinations - Hemmtest

Bei stark autoagglutinierenden Stämmen brachte auch die Langsamagglutination nicht immer klare Ergebnisse. Hier wurde der HAH - Test angewandt. Der Standardisierungsvorschlag von YODER und HOFSTAD (1964) diente bei der Durchführung als Richtlinie. Das Antigen wurde zunächst mittels 0,5 %iger Hühnererythrozyten - Suspension auf

seinen Hämagglutiningehalt untersucht. Dazu wurde auf Salk - Platten eine 2er logarithmische Verdünnung des Antigens mit gleichem Volumen 0,5 %iger Erythrozyten - Suspension zusammengebracht. Nach 1 - 2 stündigem Stehenlassen wurde abgelesen. Für den HAH - Test wurde ebenfalls auf Salk - Platten Standardserum in einer 2er logarithmischen Reihe verdünnt und mit 4 hämagglutinierenden Einheiten des Antigens versetzt. Anschließend wurde 0,5 % Hühnererythrozyten - Suspension zugesetzt und das Gemisch vorsichtig vermengt. Nach mindestens 2 stündigem Stehenlassen wurde begutachtet. Eluierung, wie z.B. bei verschiedenen Myxovirusarten, trat nicht auf. Eine Kontrolle des Testantigens, ein Standardantigen und eine Serumkontrolle wurden mitgeführt.

Pathogenität

Die Pathogenität der Mykoplasmenstämme wurde im Tierversuch ermittelt. Nach YAMAMOTO und ADLER (1958) sind Eintagsküken besonders empfindlich und zeigen nach Luftsackinokulation gut ablesbare Reaktionen. Für die Untersuchung wurden mykoplasmenfreie HNL - oder Shaver - Star - Cross Eintagshähnchen verwendet. Die *M. anatis* Stämme wurden in Hühnerküken und in Entenküken der Rasse Amerikanische Pekingente getestet. Eine Untersuchung der Taubenstämme auf ihre Pathogenität war nicht möglich, da keine mykoplasmenfreien Tauben zur Verfügung standen. Die Küken erhielten je 0,2 ml der Flüssigphase, der auf Overlay - Broth gezüchteten Stämme in den thorakalen Luftsack injiziert. Der Gehalt an lebenden Organismen wurde durch Röhrchentitration bestimmt und betrug in der Regel 10^6 - 10^8 Keime pro ml. Die Titration erfolgte wegen der langen Wachstumsdauer immer nachträglich. Die Tiere

wurden in isolierten Batterien aufgestellt und nach 72 - 96 Stunden getötet. Die pathologisch - anatomische Untersuchung erstreckte sich auf die Beurteilung des Grades der Luftsackveränderungen und den Zustand der großen Parenchyme. Rückisolierungsversuche und bakteriologische Kontrolluntersuchungen wurden nur durchgeführt, wenn Zweifel bestanden, ob es sich tatsächlich um eine Monoinfektion handelte. In Anlehnung an ZOLLI (1967) wurde nach folgendem Schlüssel bewertet:

0 = keine Läsionen

1 = Trübung der Serosa und eventuell gelb - käsige Beläge um die Einstichstelle

2 = Deutliche gelb - käsige Beläge auf den Luftsäcken der Injektionsseite

3 = Gelb - käsige Beläge auch auf den Luftsäcken der Gegenseite

4 = Gelb - käsige Beläge auf mehreren Luftsäcken und Perihepatitis bzw. Pericarditis. Das Auftreten letzterer Symptome war stets mit einer zusätzlichen E. coli - Infektion gekoppelt.

Als pathogen wurden Stämme bezeichnet, die unter den genannten Bedingungen bei mindestens 50 % der Küken Luftsackläsionen verursachten.

Aufbereitung der Mykoplasmen für die Elektrophorese

Die Aufbereitung der Mykoplasmen für die Elektrophorese selbst wurde in Anlehnung an RAZIN und ROTTEM (1967) durchgeführt. Je Stamm wurden 500,0 ml bewachsener Broth (s. Antigenherstellung) verwendet. Nach Abzentrifugieren der Flüssigkeit bei 13 000 x g über 10 min. erfolgte 2maliges Waschen in 0,25 M NaCl. Das dabei verbleibende Sediment wurde in 1,0 ml 0,25 M NaCl aufgenommen und

diese Suspension mit der doppelten Menge Phenol - Essigsäure - Wasser (2 : 1 : 0,5) verdünnt. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend in der Ultrazentrifuge (Fa. Christ) bei 30 000 x g, 15 min. sedimentiert. Der Überstand enthielt die zu untersuchenden Mykoplasmen - Eiweiße in gelöster Form. Die Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes erfolgte anhand der Biuret - Methode mit einer Eiweiß - Testpackung der Fa. HAURY, München. Die sonst zur Bestimmung des Eiweißgehaltes in Mykoplasmen-suspensionen übliche Folin - Methode erwies sich als unbrauchbar, da sich bei der Untersuchung der Phenol - Essigsäure - Wasser - Lösung Ausflockung ergab. Anhand der gemessenen Werte wurden die Lösungen durch entsprechende Verdünnung mit Phenol - Essigsäure - Wasser auf einen Eiweißgehalt von 3,0 mg/ml eingestellt. Lag der Eiweißgehalt niedriger, so wurde der Stamm nochmals vermehrt und die Aufbereitung von neuem durchgeführt, da eine sichere Methode zur Schätzung der Keimdichte in Broth nicht bekannt ist. Die Keimzahltitrierung fand wegen des hohen Zeitaufwandes von 10 Tagen keine Verwendung. Die gebrauchsfertigen Lösungen der Mykoplasmen-eiweiße wurden bis zur Untersuchung in der Elektrophorese bei +4,0°C aufbewahrt.

Elektrophorese und Auswertung

Es wurde vertikale PAA-Gel-Elektrophorese mit diskontinuierlichem Puffersystem durchgeführt. Auf ein Proben- und Sammelgel wurde verzichtet. Das zylindrische, etwa 6 cm lange Trenngelsäulchen enthielt 7,5 % Acrylamid, 35,0 % Essigsäure und 8 M Harnstoff. Der pH - Wert des Gels lag bei 4,5. In jeder Elektrophorese wurden 4 Gele dem Stromfluß gleichzeitig ausgesetzt. Jedes Röhrchen enthielt die selbe Eiweißlösung, so daß pro Durchgang jeweils 1 Stamm

zur Untersuchung kam. Für die Durchführung der Elektrophorese wurden folgende Substanzen benötigt bzw. hergestellt:

Lösung A: (Stammlösung)

Acrylamid	1,004 g
N'N'Dimethylenbisacrylamid	0,0267 g
Harnstoff	6,436 g
Eisessig	4,688 ml
Aqua bidest.	ad 12,500 ml

Lösung B: (Katalysator)

Ammoniumperoxodisulfat	0,6 g
Aqua bidest.	ad 10,0 ml

Lösung C: (Katalysator)

N, N, N', N' - Tetramethylen-diamin (handelsüblich)

Lösung D: (Dichtegradient)

Saccharose	1,0 g
Eisessig	1,25 ml
Aqua bidest.	ad 2,5 ml

(Saccharose in aqua bidest. ad 1,25 lösen, dann 1,25 ml Eisessig dazugeben und mischen)

Lösung E: (Färbelösung n. SCHMITT, 1968)

Amidoschwarz 10 B	1,0 g
Eisessig	7,0 ml
Natriumacetat	1,6 g

Glycerin	10,0 ml
Aqua bidest.	ad 100,0 ml

(Die Lösung mindestens 1 x filtrieren)

Zusätzlich benötigt man 10 %ige, 35 %ige und 75 %ige Essigsäure in entsprechender Menge.

Zur Herstellung der Arbeitslösung für 4 Gele wurden 7,5 ml von Lösung A, 0,5 ml von Lösung B und 0,038 ml von C gut vermischt. In Glasröhrchen (11 cm lang, 0,6 cm Durchmesser), die mit dem unteren Ende in Gummistöpseln standen, wurden je 1,8 ml dieser Lösung pipettiert. Nach vorsichtigem Überschichten mit 35 %iger Essigsäure wurden sie zur Polymerisation für 1 Stunde im Brutschrank bei 37⁰C inkubiert. Dann wurde die Essigsäure abgegossen und die dabei zurückbleibenden Säuretröpfchen an Röhrcheninnenwand und Geloberfläche mittels watteumwickelter Holzstäbchen entfernt. In den Raum über dem Gel wurde bei 2 Röhrchen 0,05 ml, bei den beiden anderen 0,1 ml Eiweißlösung desselben Stammes pipettiert. Dazu kam je Röhrchen 0,05 ml Dichtegradient (Lösung D). Durch Schütteln wurden die Substanzen vermischt. 0,5 ml 75 %iger Essigsäure wurden vorsichtig überschichtet und dann der verbleibende Raum bis zum oberen Rand des Röhrchens mit 10 %iger Essigsäure gefüllt. Nachdem die Gläschen in die Elektrophoresekammern eingesetzt waren, wurden diese mit 10 %iger Essigsäure beschickt. Die Polung des Netzgerätes (VOKAM - Gerät der Fa. SHANDON) erfolgte so, daß sich die Kathode in der unteren Pufferkammer befand. Bei konstanter Stromstärke von 5 mA pro Röhrchen wurde die Elektrophorese für die Dauer von 2,5 Stunden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Dann wurden die Gele vorsichtig ausgelöst und 1 Stunde in 1 %iger Amidoschwarzlösung (Lösung E) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch Aus-

waschen des ungebundenen Farbstoffes mit 10 %iger Essigsäure, die möglichst häufig gewechselt wurde. Nach 3 Tagen waren die Gele entfärbt. Die photometrische Aufzeichnung der Banden im Gel erfolgte mit einem, zu diesem Zweck umgebauten Photometer der Fa. CARL ZEISS (SCHELLNER, 1970), das mit einem Servoschreiber der Fa. HEATHKIT gekoppelt war. In diesem System betrug die Geltransportgeschwindigkeit 2,2 cm/min. und der Schreibervorschub 6,1 cm/min. Der Nullpunkt auf dem Pherogramm wurde durch den starken Ausschlag des Schreibers beim Eintritt des Photometerlichtstrahles ins Gel markiert. Als zweiter Bezugspunkt für die Berechnung der relativen Wanderungsgeschwindigkeit (R-Wert) der Mykoplasmeneweisse diente eine auffallend starke Bande. Sie war bei jedem der untersuchten Stämme vorhanden und lag im Pherogramm etwa 6,0 cm vom Nullpunkt entfernt. Der R-Wert der einzelnen Fraktionen wurde anhand der Pherogramme folgendermaßen berechnet. Durch den Nullpunkt wurde eine Senkrechte gezeichnet. Von dieser Linie aus wurde die Entfernung zur obengenannten Referenzbande mit dem Lineal gemessen und mit 3 multipliziert. Die Entfernung eines Peaks vom Nullpunkt, dividiert durch die dreifache Entfernung der Referenzbande, multipliziert mit 100, ergab die relative Wanderungsgeschwindigkeit der fragten Eiweißfraktion. Da bei der hier angewandten Auswertungsmethode die Pherogramme etwa 18 cm lang waren, konnten durch die beschriebene Verdreifachung R - Werte zwischen 0 und 100 erlangt werden. Aus den 4 Pherogrammen eines Elektrophoreselaufes wurde der R - Wert für jede einzelne Bande berechnet und das arithmetische Mittel gebildet. So erhielt jede Eiweißfraktion einen zugehörigen R - Wert. Diese Zahlen dienten als Grundlage für den Vergleich der Mykoplasmenstämme. Außerdem wurden auffallende Zacken im Pherogramm, die auf einen relativ großen Anteil einer Eiweißfraktion hinweisen, als Unterscheidungsmerkmale mit herangezogen. Jeder Stamm wurde mindestens zweimal der Elektrophorese unterzogen.

VORVERSUCHE

Die beschriebene Methode zur Berechnung der relativen Wanderungsgeschwindigkeit ist das Ergebnis einer Reihe von Vorversuchen, die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

Um objektiv vergleichbare Ergebnisse zu erlangen, erschien es notwendig, die relative Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fraktionen zu bestimmen. Bei der Vielzahl der Banden erwies sich ein visueller Vergleich als unzureichend. Bei der Untersuchung von Blutseren im PAA-Gel wird die Bestimmung der R - Werte mittels der immer vorhandenen Albuminbande vorgenommen. BRÜCKLER und BLOBEL (1969) benützten die am weitesten gewanderte Eiweißfraktion. Da bei der Auftrennung von Mykoplasmen ein entsprechender Anhaltspunkt zunächst nicht zu finden war, wurde eine Substanz gesucht, die im richtigen Verhältnis zu den Eiweißfraktionen im Gel mitwandert. Von den Farbstoffen, die im sauren Milieu mit der Granzschicht zur Kathode wandern, wurden Methylenblau, Methylrot, Rhodamin, Methylgrün, Methylviolett und Pyronin G auf ihre diesbezügliche Eignung untersucht. Die Substanzen wurden dem Dichtegradienten beigemischt und der Elektrophorese unterzogen. Die Gele waren 7,5 %ig und enthielten 35 % Essigsäure und 5 molaren Harnstoff. Methylenblau zeigte keine Konzentrierung, wanderte zu schnell und wurde sehr bald ausgewaschen. Methylrot und Rhodamin wanderten langsam genug, wurden aber nicht zu einer Bande konzentriert und ermöglichten daher keine exakte Auswertung. Sie scheinen lediglich zur Anzeige der Pufferfront geeignet. Methylgrün und Methylviolett wurden gut konzentriert, wanderten jedoch zu schnell. Sie können nur

bei einer Laufzeit von 1 1/2 Stunden Verwendung finden. Nur Pyronin G zeigte in dieser Versuchsanordnung eine angemessene Wanderungsgeschwindigkeit, wurde verhältnismäßig gut konzentriert und widerstand dem dreitägigen Auswaschen am besten. Von einer 0,7 %igen Lösung des Farbstoffes in Phenol - Essigsäure - Wasser wurden zwei Tropfen dem Eiweiß - Dichtegradient - Gemisch beigegeben und so 150 Gele der Elektrophorese unterzogen. Die Pherogramme der 20, auf diese Weise untersuchten Stämme, wurden anhand der mit Hilfe der Pyronin - Bande errechneten R - Werte verglichen. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse schlecht zu vergleichen waren, da die R - Werte gleicher Eiweißfraktionen erheblich schwankten. Nimm man eine Bande, die etwa in der Mitte des Kurvenbildes lag, als Anhaltspunkt für den Vergleich, so waren Abweichungen im R - Wert von maximal $\pm 2,0$ auf den Pherogrammen der Gele eines Laufes nicht selten. Noch größere Ungenauigkeit zeigte sich, sobald Pherogramme verschiedener Elektrophoreselaufe verglichen wurden. So erwies sich auch Pyronin G als Anhaltspunkt zur Berechnung der R - Werte der Eiweißfraktionen als ungeeignet.

Im Laufe dieser Untersuchungen fiel auf den Pherogrammen eine besonders starke Bande im Bereich von ca. 6 cm absoluter Wanderungsgeschwindigkeit auf. Diese Bande war bei allen untersuchten Stämmen vorhanden. Sie wurde im Hauptversuch als Referenzbande zur R - Wertberechnung herangezogen. Dies entspricht der Methode von GLICK (1967), der bei seinen Untersuchungen von Serumproteinen die im vorderen Drittel der Fraktionenskala liegende Transferinbande als Referenzbande verwendet.

Die Reproduzierbarkeit konnte dadurch weiter verbessert werden, daß die Harnstoffmolarität im Gel von 5 auf 8 erhöht wurde. Bei der im Hauptversuch angewandten Methode

betrug dann die R - Wertschwankung einer mittleren Bande in den Pherogrammen eines Laufes nur noch maximal $\pm 0,5$, während zwischen den Pherogrammen aller untersuchten Stämme z.B. die Bande bei R - 51 um maximal $\pm 1,8$ schwankte.

ER G E B N I S S E

Aus Tabelle 1 gehen die morphologischen, biochemischen, serologischen und pathogenetischen Eigenschaften der untersuchten Mykoplasmenstämme hervor.

Abkürzungen in Tabelle 1a - c :

G = Glukose	n.d. = nicht durchgeführt
M = Maltose	f.r. = fraglich
TTC = Tetrazoliumchlorid	m.N. = mit Niederschlag
HA = Hämagglutination	krist. = kristallbildend
Serol. = Serologie	gr. = große
HAH = Hämagglutinations- hemmtest	mittelgr. = mittelgroße
A = Agglutination	

Bei der Untersuchung der Einzelorganismen zeigten alle Stämme Zellen von coccoider Form.

Die Untersuchung auf Arginindecaboxylase wurde nur bei den Stämmen F, CNG, TU, 1595/71 und den Putenstämmen 830/71, 831/71, 832/71, 834/71 und 705/71 durchgeführt. Die Referenzstämmen von *M. gallisepticum* F und CNG, der Serotyp C - Stamm TU und der Feldstamm 1595/71 waren negativ. Die 5 Putenstämmen bewirkten dagegen beim biochemischen Test sehr deutlichen Farbumschlag in Röhrchen d., was ihre Fähigkeit Arginindecaboxylase zu bilden beweist.

Tabelle 1a

Stamm	Herkunft	Morphologie	Biochemie			HA	Serol.		Pathogenität im
		Kultur	G	M	ATC		HAH	A	Eingagskiken
<u>1. M. GALLISEPTICUM</u>									
<u>REFERENZSTÄMME</u>									
A 5969	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
S 208	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
CNG	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
F	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
PH	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
SCH	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
REI	ADLER/DAVIS	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
699	Fa. AEROTT	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
<u>FELDISOLATE</u>									
584/67	Huhn	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
871/2/70	Pute	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
459/70	Pute	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
316/1/70	Huhn	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
316/3/70	Huhn	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
1219/b/67	Huhn	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
150?	Huhn	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen
1019/4/68	Huhn	pleomorph	+	+	+	+	+	+	pathogen

Tabelle 1b

Stamm	Herkunft	Morphologie	Biochemie			HA	Serol.		Pathogenität im
		Kultur	G	M	TTC		HAH	A	Eintagsküken
<u>Fortsetzung M. GALLISEPTICUM</u>									
486/67	Huhn	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
316/4/70	Huhn	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
830/71	Pute	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
831/71	Pute	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
832/71	Pute	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
834/71	Pute	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
705/71	Pute	pleomorph	+	+		+	+	+	pathogen
<u>2. M. GALLINARUM</u>									
19708	USTCO	mittelgr. Kolonien	-	-	+			-	apathogen
<u>3. M. ANATIS</u>									
1340 (R)	ROBERTS/WEYBR.	große Kolonien	+	+	-	+		-	entenpathogen
725 (F)	Ente	große Kolonien	+	+	-	+		-	entenpathogen
1113 (F)	Ente	große Kolonien	+	+	-	+		-	entenpathogen
<u>4. TAUBENSTÄMME</u>									
649 (R)	YODER/ATHENS	kleine Kolonien	-	-	+			-	n.d.
773/70(F)	Taube	krist.gr. Kolonien	-	-	-			-	n.d.
642 (F)	Taube	krist.gr. Kolonien	-	-	+			-	n.d.
664/70(F)	Taube	krist.gr. Kolonien	-	-	+			-	n.d.
651/70(F)	Taube	krist.gr. Kolonien	-	-	+			-	n.d.

Tabelle 1c

Stamm	Herkunft	Morphologie	Biochemie		HA	Serol.		Pathogenität im
		Kultur	G	M	TTC	HAH	A	Eintagsküken
5. WS 7	EDE/ENGLAND	große Kolonien	-	-	-	+	fr.	apathogen
6. SEROTYP C								
TS (K)	ADLER/DAVIS	große Kolonien	+	+	-	-	-	apathogen
66/69 (F)	Huhn/Gehirn	mittelgr. Kolonien	+	+	-	-	-	gering pathogen
947/69 (F)	Huhn	mittelgr. Kolonien	+	+	-	-	-	gering pathogen
1595/71 (F)	Pute	pleomorph	+	+	n.d.	-	-	n.d.
7. A. LAIDLAWII								
H3P10 (R)	ADLER/DAVIS	mittelgr. Kolonien	+	+	m.N.	-	-	apathogen
8. NICHT EINZUORDNEN								
366/70 (F)	Huhn, über Ei	mittelgr. Kolonien	-	-	-	-	-	apathogen
1199/70 (F)	Pute	mittelgr. Kolonien	+	+	-	-	-	apathogen
1037/69 (F)	Huhn	mittelgr. Kolonien	+	+	-	n.d.	n.d.	hochpathogen
1146/69 (F)	Huhn	mittelgr. Kolonien	+	+	-	-	-	apathogen
403/71 (F)	Pute	pleomorph	+	+	-	-	-	pathogen
1092/1/69 (F)	Huhn	kleine Kolonien	-	-	-	-	-	hochpathogen
604/70 (F)	Huhn	krist.gr. Kolonien	-	-	+	-	-	apathogen
1790/70 (F)	Huhn	krist. Kolonien	+	+	-	-	-	apathogen

Die Eigenschaften der Referenzstämme stimmten mit Ausnahme der Pathogenität von *M. anatis* 1340 mit der Literatur überein. Dieser Stamm ist nach hier durchgeführten Untersuchungen für Enten pathogen. Der WS 7 - Stamm wurde auf Grund seiner Besonderheiten in Übereinstimmung mit ROBERTS (1969) nicht als *M. gallisepticum* angesprochen.

Die Putenfeldstämme 830/71, 831/71, 832/71, 834/71 und 705/71 wurden zunächst auf Grund ihrer biochemischen und serologischen Eigenschaften als *M. gallisepticum* angesehen. Durch den Nachweis einer von ihnen gebildeten Arginindecarboxylase unterschieden sie sich aber insgesamt eindeutig von dieser Spezies. Da laut Literatur (FABRIKANT, 1969) nur der Serotyp I neben der Kohlehydratspaltung und der TTC - Reduktion die Arginindecarboxylase aufweist, müssen die 5 Putenstämme diesem, in Deutschland bisher nicht beschriebenen Typ zugeordnet werden. Der serologische Nachweis, daß es sich um Serotyp I handelt, steht noch aus.

Die dem Serotyp C zugeordneten Feldstämme stimmten mit dem Referenzstamm gut überein.

Die beiden *M. anatis* - Feldstämme glichen dem Referenzstamm auch bezüglich der Pathogenität.

Bei den Taubenfeldstämmen fallen, im Gegensatz zum Referenzstamm, die großen, kristallbildenden Kolonien auf. Biochemisch sind die Stämme mit Ausnahme von 773/70, der

kein TTC reduziert, einheitlich.

8 Feldstämme ließen sich nach dem herkömmlichen Untersuchungsschema keiner bisher bekannten Spezies zuordnen. Die Stämme 1037/69, 403/71 und 1092/1/69 sind für Hühnerküken deutlich pathogen. Da es in der Literatur keine Hinweise auf nannerpathogene Stämme gibt, die nicht *M. gallisepticum* oder *M. synoviae* zuzuordnen sind, handelt es sich hier um Isolate, die von besonderem klinischen und epidemiologischen Interesse sind. Während die Stämme 1037/69 und 403/71 TTC - negativ sind, vergärt 1092/1/69 auch keine Kohlehydrate. Es ist also keine einheitliche Stammgruppe.

Die 45 untersuchten Mykoplasmenisolate zeigten bei der elektrophoretischen Auftrennung im Gel je nach Stamm 15 bis 27 verschiedene, angefärbte Banden. Insgesamt wurden 42 Fraktionen mit verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten gefunden. In Abhängigkeit von der Proteinmenge der jeweiligen Eiweißfraktion und von der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld waren die Banden verschieden dick und verschieden scharf (MAURER, 1968). In Tabelle 2a - d werden die R - Werte der bei den verschiedenen Stämmen gefundenen Fraktionen aufgeführt.

Tabelle 2b

Portsetzung M. GALLISEPTICUM		b. Biochem., serol., nicht M. gallisepticum, pathogen, uneinheitlich, elektrophoretisch M. gallisepticum		c. Biochem., serol., pathogen, M. gallisepticum, elektrophoretisch nicht M. gallisepticum		2. Vermutlich SEROTYP I	
366							
1199							
1037							
316/4							
486/67							
830							
831							
832							
834							
705							

Tabelle 2d

[illegible]

Die Zahlen oben waagerecht stellen die Mittelwerte aller errechneten R-Werte der verschiedenen Elweilfraktionen dar. In der Klammer hinter diesen Zahlen ist jeweils der höchste und niedrigste R-Wert angegeben, der bei der entsprechenden Fraktion auftrat. Doppelte Kreuze in der Tabelle bedeuten, daß hier zwei sehr nahe zusammen liegende Zacken auftraten, die einem R-Wert zugeordnet wurden.

Tabelle 2

1. M. GALLISEPTICUM										2. VERMUTLICH SEROTYP I										3. M. GALLINARUM										4. M. ANATIS										5. TAUBENSTÄMME										6. WS 7										7. SEROTYP C										8. A. LAIDLAWII										9. NICHT EINZUORDNEN									
		1a.:		1c.:		20,4		44,3		51,1		58,0		73,6		82,6		96,8				20,4		44,3		51,1		58,0		73,6		82,6		96,8																																																							
		A5969		316/4	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																								
		S6	+	486	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																								
		CNG	+																																																																																						
		F	+																																																																																						
		PH	+																																																																																						
		SCH	+																																																																																						
		REI	+																																																																																						
		699	+																																																																																						
		584	+																																																																																						
		871	+																																																																																						
		459	+																																																																																						
		316/1	+																																																																																						
		316/3	+																																																																																						
		1219	+																																																																																						
		1502	+																																																																																						
		1019	+																																																																																						
		1b.:																																																																																							
		366	+																																																																																						
		1199	+																																																																																						
		1037	+																																																																																						

Aus der Vielzahl von Banden fiel das Vorhandensein bzw. Fehlen bestimmter, deutlich ausgeprägter Zacken auf, die deshalb als Differenzierungskriterium besonders geeignet erschienen. In Tabelle 3 (Seite 43) sind alle untersuchten Stämme diesbezüglich **verglichen**.

Unterschiede zwischen den Mykoplasmenstämmen zeigten sich nicht nur im Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Eiweißfraktionen. Einige Spezies bzw. Stämme wiesen Eigenheiten wie spezifische Bandenfolge oder besonders deutliche Zacken im Pherogramm auf. Das Hervortreten einer Fraktion im Kurvenbild wird durch eine größere Menge ihres anfärbbaren Eiweißanteils bedingt. Die Abbildungen 1 - 10 zeigen die Pherogramme der untersuchten Referenzstämmen, des Putenstammes 831/71 und des Isolates 1092/69, das nicht einzuordnen war.

M.gallisepticum

S6 208

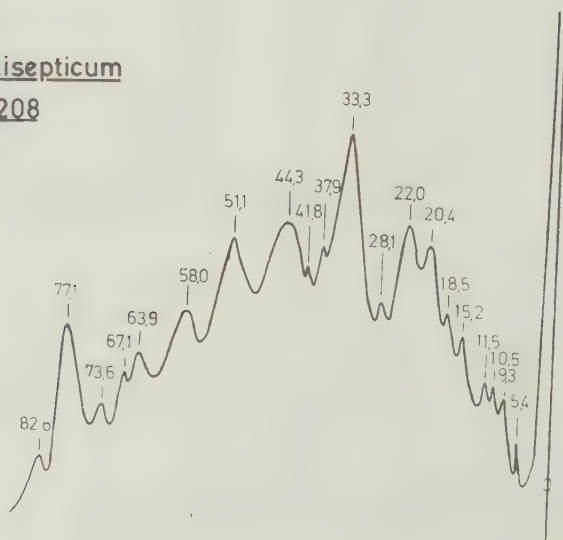


Abbildung 1

M. gallisepticum
A 5969



Abbildung 2

M. gallinarum
19708 U.S.T.C.C.



Abbildung 3

M. anatis

1340

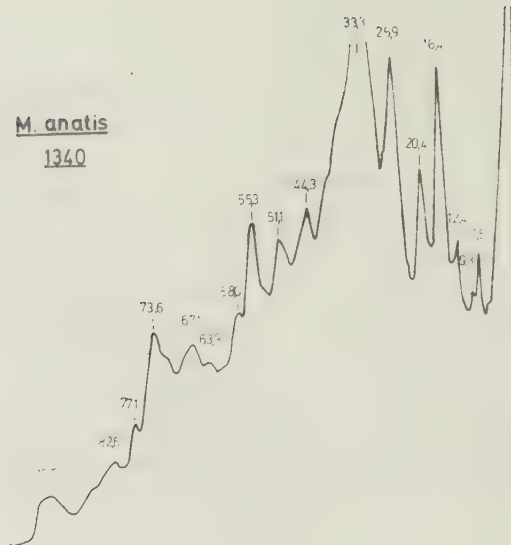


Abbildung 4

Serotyp L

649

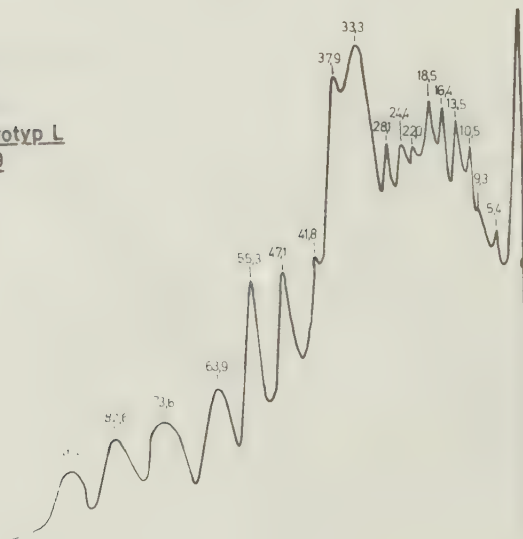


Abbildung 5

WS 7



Abbildung 6

Serotyp C
TU



Abbildung 7

A. laidlawii
H.P.
-3-10-

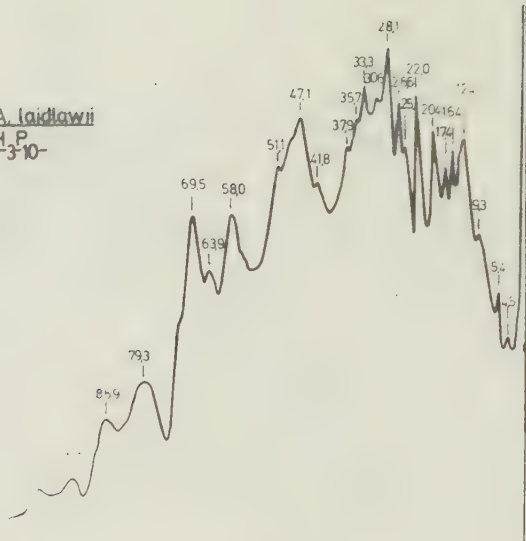


Abbildung 8

Putenstamm
831/71



Abbildung 9



Abbildung 10

Die Abhängigkeit der Dicke und Schärfe der Banden und des entsprechenden Kurvenbildes von der Eiweißkonzentration der entsprechenden Mykoplasmenpräparation, zeigte sich besonders deutlich, wenn dieselbe Ausgangslösung in mehreren Verdünnungen der Elektrophorese unterzogen wurde. Bei höheren Eiweißmengen wurden zwar auch noch kleinere Fraktionen sichtbar, die dicken Banden der stärkeren Fraktionen wurden jedoch sehr unscharf und überlagerten teilweise kleinere Banden. Niederere Eiweißmengen gaben klare, scharfe Banden, schwächere Fraktionen wurden jedoch oft nicht mehr im Gel sichtbar. Als günstig, auch bezüglich der Reproduzierbarkeit, erwies sich das Auftragen von 0,15 - 0,3 mg Eiweiß (n. BIURET) aufs Gel. Deshalb wurde auch auf je 2 Röhrchen eines Laufes 0,05 und 0,1 ml der Eiweißlösung (3,0 mg/ml) gegeben. In dieser Anordnung war die Methode

gut reproduzierbar. Bei den Werten von 4 Gelen eines Laufes lag die Schwankungsbreite bei maximal $\pm 0,5$, während im Vergleich der Zahlen aller Meßwerte z.B. die Bande 20,4 um maximal $\pm 0,6$, die Bande 51,1 um maximal $\pm 1,8$ und 82,6 um maximal $\pm 2,2$ schwankte. Die Steigerung der Schwankung wird dadurch bedingt, daß die Wärmeentwicklung im Gel während des Laufes geringe Strukturänderungen durch Quellung nach sich zieht, die schnell wandernde Banden mehr beeinflussen als solche mit relativ geringer Wanderungsgeschwindigkeit.

Eine Abhängigkeit von der Art des Serumzusatzes zur Kulturflüssigkeit (Huhn, Schwein, Pferd) war nicht feststellbar. Die Referenzbande 33,3 trat bei Verwendung unbewachsener, steriler Kulturflüssigkeit und bei bakteriell verunreinigter Broth nicht auf.

Die Untersuchung mit der Elektrophorese dauerte einschließlich der Stammvermehrung durchschnittlich 10 Tage.

Von den Referenzstämmen ausgehend wurden die R - Werte und die Kurvenbilder der zur Untersuchung gelangten Isolate verglichen. Die Stämme konnten anhand der Elektrophorese in 9 unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden:

1. M. gallisepticum

- a. Biochemisch, serologisch, pathogenetisch und elektrophoretisch einheitlich (alle Referenzstämmen und 8 Feldstämmen).

- b. Biochemisch und serologisch nicht *M. gallisepticum* (3 Feldstämme), 2 Stämme apathogen, einer hochpathogen, alle 3 Stämme der Gruppe elektrophoretisch nicht von *M. gallisepticum* zu unterscheiden.
- c. Biochemisch, serologisch und pathogenetisch *M. gallisepticum*, elektrophoretisch nicht *M. gallisepticum* (2 Feldstämme).

2. Vermutlich Serotyp I

Biochemisch, serologisch, pathogenetisch und elektrophoretisch einheitlich (5 Feldstämme).

3. *M. gallinarum*

(1 Referenzstamm)

4. *M. anatis*

Biochemisch, serologisch, pathogenetisch und elektrophoretisch einheitlich (1 Referenzstamm, 2 Feldstämme).

5. Taubenstämme

Biochemisch nicht einheitlich (773/70 keine TTC - Reduktion), serologisch und elektrophoretisch einheitlich (1 Referenzstamm, 4 Feldstämme).

6. WS 7

(1 Referenzstamm)

7. Serotyp C

Biochemisch, serologisch und elektrophoretisch einheitlich, Referenzstamm apathogen, 2 Feldstämme gering pathogen (1 Referenzstamm, 3 Feldstämme).

8. A. laidlawii

(1 Referenzstamm)

9. Nicht einzuordnende Stämme

Biochemisch, serologisch, pathogenetisch und elektrophoretisch uneinheitlich (5 Feldstämme).

Im Einzelnen wurden für die Gruppen folgende Kriterien für die elektrophoretische Differenzierung gefunden:

Bei den 8 untersuchten Referenzstämmen von *M. gallisepticum* fiel als erstes eine immer wieder auftretende Bandenkombination am Ende des Pherogramms auf, die auch im Gel wahrzunehmen war. Die Zacken mit den R - Werten 73,6, 77,1 und 82,6 zeigten sich immer derart angeordnet, daß R - 77,1, R - 73,6 und R - 82,6 um mindestens das Doppelte überlagerte. R - 82,6 stellte immer die letzte meßbare Bande dar. Allen Stämmen waren die Banden mit den R - Werten 20,4, 44,3, 51,1, 73,6, 77,1 und 82,6 gemeinsam. R - 44,3, R - 51,1 und 58,0 waren immer als hohe, deutlich abgesetzte Peaks zu sehen. Die Referenzstämmen waren diesbezüglich einheitlich, unterschieden sich aber in anderen Bandenbereichen, wobei das Fehlen oder Vorhandensein einzelner Proteinfractionen stark variierte. Von den, mit den herkömmlichen Differenzierungsmethoden dem Serotyp A zugeordneten Feldisolaten, konnten 8 Stämme in der Elektrophorese von den Referenzstämmen nicht unterschieden werden. Dem Stamm 459/70 fehlte zwar die Bande R - 58,0, aber alle anderen *M. gallisepticum* - typischen Merkmale waren vorhanden. Die Stämme 366/70, 1199/70 und 1037/69 (Gruppe 1 b), die biochemisch und serologisch *M. gallisepticum* nicht glichen, wiesen alle als charakteristisch angesehenen Banden auf, die auch bei den Referenzstämmen vorkommen. Die Stämme 316/4/70

und 486/67 (Gruppe 1 c) zeigten bei der biochemischen und serologischen Untersuchung typische Merkmale für *M. gallisepticum*. Bei der Elektrophorese fehlte jedoch die Bandenfolge 73,6, 77,1 und 82,6 und bei 316/4/70 eine Bande R - 51,1. Außerdem trat bei beiden bei R - 91,6 eine deutlich gefärbte Fraktion auf.

Die Gruppe 2 besteht aus Putenstämmen, die biochemisch wie Serotyp I reagieren, serologisch mit *M. gallisepticum* - Antiserum agglutinieren und in der Elektrophorese eine einheitliche Gruppe darstellen. Allen Stämmen war gemeinsam, daß der Referenzbande eine gleichhohe Bande R - 30,6 vorgeschaltet war und diese beiden Fraktionen auf einem "gemeinsamen Stiel" saßen (Abb. 9), wie es auch bei WS 7 auftrat. Weitere Unterschiede zwischen diesen 5 Putenstämmen und den anderen Isolaten werden auch in Tabelle 3 deutlich. R - 20,4, R - 44,3, R - 51,1, R - 58,0 und R - 73,6 fehlen allen.

M. gallinarum zeigte eine Besonderheit in der zweiten Hälfte des Pherogrammes. Es traten dort drei Doppelbanden auf, R - 47,1 - R - 51,1, R - 58,0 - R - 63,9 und R - 69,5 - R - 73,6. Die Fraktionen waren etwa gleich stark und deutlich ausgebildet (s. Abb. 3). Von den Feldisolaten konnte der Spezies *M. gallinarum* kein Stamm zugeordnet werden. Laut Tabelle 3 fehlt diesem Stamm im Gegensatz zu *M. gallisepticum* die Bande 20,4.

Beim Referenzstamm *M. anatis* 1340 war eine Fraktion R - 58,0 vorhanden, doch sie setzte sich aus einer so geringen Menge Eiweiß zusammen, daß sie im Pherogramm nur angedeutet erscheint. Dasselbe gilt für die Bande mit dem R - Wert 82,6.

Charakteristisch für *M. anatis* war das Kurvenbild. Die einzelnen Peaks sind deutlich voneinander abgesetzt und oft von auffallender Höhe. Kleine, eng zusammenliegende Banden in der ersten Hälfte des Pherogrammes, wie sie bei den meisten anderen Spezies zu sehen sind, traten kaum auf. Auffallend war eine starke Bande bei R - 25,9. Diese Fraktion war bei den anderen Stämmen, wenn überhaupt, nur sehr schwach vorhanden. Neben R - 25,9 waren besonders R - 55,3 und R - 73,6 betont. Alle diese Eigenschaften bis auf die angedeuteten Banden bei R - 58,0 und R - 82,6 zeigten sich auch bei den Feldisolaten 725 und 1113. Die Zuordnung dieser Stämme zu *M. anatis* mittels herkömmlicher Identifizierungsmethoden wurde somit auch in der Elektrophorese bestätigt.

Das Kurvenbild des Tauben - Referenzstammes 649 (Serotyp L) war dem von *M. anatis* nicht unähnlich. Besonders in der zweiten Hälfte des Pherogrammes traten relativ hohe und gut abgesetzte Peaks auf. Doch fehlte im Gegensatz zu den Entenstämmen die Bande bei R - 44,3 und R - 96,8. Der Unterschied zu den anderen Gruppen in den Eiweißfraktionen wird aus Tabelle 3 deutlich. Die Feldstämme 773, 642, 664 und 651 ließen sich dem Serotyp L zuordnen.

Der Stamm WS 7 zeigte keine hervortretenden Eigenheiten. Lediglich die Banden bei R - 6,4 und R - 55,3 waren extrem deutlich. Das Fehlen der Bande 82,6 und der charakteristischen Bandenfolge R - 73,6, R - 77,1, R - 82,6 unterscheidet ihn von *M. gallisepticum*. Außerdem war eine Bande bei R - 96,8 ausgeprägt. Der Stamm ist also auch auf Grund der elektrophoretischen Untersuchung kein Serotyp A - Isolat.

Dem Serotyp C wurden die Feldstämme 66/69, 947/69 und 1595/71 zugeordnet. Als wichtigstes Kriterium diente das Auftreten von drei, etwa gleich starken Eiweißfraktionen bei R - 51,1, R - 55,3 und R - 58,0, die auch bereits bei der Betrachtung der Gelsäulchen auffielen. Zudem trat bei R - 79,3 eine deutliche Bande auf, die nur bei diesen Stämmen in dieser Art zu beobachten war. Bei 1595/71 war R - 55,3 schwächer als bei den anderen Stämmen dieser Gruppe. Die Zuordnung dieses Isolates erfolgte auf Grund der Ähnlichkeit des Kurvenbildes. Auch passten die R - Werte ins Schema der Tabelle 3.

Bei *A. laidlawii* ist die Referenzbande R - 33,3 schwer zu finden. Sie ist von vielen kleinen Zacken umgeben und wird von R - 28,1 überragt, was bei keinem der anderen untersuchten Stämme der Fall war. Außerdem liegt bei R - 47,1 eine relativ "breitgezogene" Fraktion, die auf einen besonders hohen Anteil eines Eiweißes schließen läßt. Die letzte meßbare Bande hat einen R - Wert von über 100, was nur noch beim Serotyp C auftritt.

Die 9. Gruppe wird von 5 Isolaten gebildet, die anhand der hier gefundenen Kriterien zu keiner der Gruppen gehören und auch untereinander uneinheitlich erscheinen.

D I S K U S S I O N

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das von RAZIN und ROTTEM (1967) verwendete Gelsystem etwas abgeändert. Diese Autoren arbeiteten mit Gelen, die Harnstoff in 5 molarer Konzentration enthielten. Da der Harnstoffgehalt im Gel ein Faktor ist, der die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflusst, indem er, zusammen mit der Essigsäure, die gelösten Eiweißanteile der Mykoplasmenzellen daran hindert, sich während des Elektrophoreselaufes zu reaggregieren, erschien die Erhöhung der Molarität als ein Vorteil. Auch THEODORE et al. (1970) inkorporieren 8 molaren Harnstoff in ihr Gelsystem. Die hohe Konzentration hat den Nachteil, daß die Grenze der Harnstofflöslichkeit fast erreicht wird. So kann es bei geringer Verunreinigung der Stammlösung leicht zum Auskristallisieren des Harnstoffes kommen. Der Vorteil der verbesserten Reproduzierbarkeit wiegt jedoch diesen arbeitstechnischen Nachteil auf. Eine weitere Abänderung ist die Benutzung von gelöstem Ammoniumperoxodisulfat. Wie oben erwähnten Autoren setzen für jeden Gebrauch neue Katalysatorlösung an, da die Substanz schnell ihre Wirksamkeit einbüßt. Bei der hier angewandten Methode wurde die Lösung nur einmal in 14 Tagen neu bereitet und bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Es war keine Verringerung der katalysierenden Eigenschaften bei der Polymerisation festzustellen und der Ansatz einer größeren Menge, von der je nach Bedarf genommen werden konnte, stellte eine Arbeitsvereinfachung dar. Ähnlich verhält es sich mit der Färbelösung für Gele. RAZIN und ROTTEM (1967), ROTTEM und RAZIN (1967), RAZIN (1968), SACKS (1969) und andere

verwenden 1 %iges Amidoschwarz in 7 %iger Essigsäure. Diese Lösung verliert jedoch nach einigen Tagen an Farbekraft, während die Färbelösung nach SCHMITT (1968) erheblich länger brauchbar bleibt und außerdem den Vorteil hat, daß die Gele durch das Glycerin geschmeidiger werden und dadurch die Handhabung erleichtert wird.

Von mehreren Autoren wurde erwähnt, daß Phenol - Essigsäure - Wasser als Lösungsmittel für die Proteine gut brauchbar ist. Dies kann nur bestätigt werden. Mykoplasmenproben, die ein Jahr lang im Kühlschrank gelagert waren, zeigten keine Änderung in ihren Eigenschaften. Von den etwa 60 verschiedenen Proben bildeten sich nur bei vierein nach monatelänglichem Stehen Aggregate, die durch Schütteln wieder zu lösen waren. Bei der Proteinbestimmung der Lösungen trat die Ph. - E. - W. - Lösung als störender Faktor auf. Mit der Folin - Methode nach LOWRY (1951), die von den oben genannten Autoren bei derartigen Untersuchungen verwendet wurde, bildet sich ein flockiger Niederschlag, sodaß eine photometrische Messung nicht möglich ist. Die erwähnten Untersucher bestimmten den Eiweißgehalt der Zellsuspensionen bevor diese in Ph. - E. - W. für die Elektrophorese gelöst wurden. Da jedoch nach der Lösung noch einmal zentrifugiert wird und das Sediment, das deutlich nachweisbare Proteine enthält, verworfen wird, scheint die Eiweißbestimmung der gebrauchsfertigen Lösung sinnvoller. Da mit der Eiweißtestpackung der Fa. HAURY, München, eine Bestimmung nach der Biuret - Methode möglich ist, bei der die Phenol - Essigsäure - Wasser - Lösung keine Störung verursacht, wurde diese Methode bevorzugt. Der Nachteil liegt darin, daß die Biuret - Methode nicht die Empfindlichkeit der Folin - Methode aufweist. Erstere mißt nur Peptide und Proteine, während letztere auch Aminosäuren, Phenole und

Harnsäure erfasst (RICHTERICH, 1968). In dieser Versuchsanstellung ist die Eiweißbestimmung im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von Bedeutung; auf das Erfassen bestimmter Komponenten wird weniger Wert gelegt.

Da die aufs Gel gebrachte Eiweißmenge zur Stärke der auftretenden Banden direkt proportional ist, hängt eine vergleichende Aussage in Bezug auf den quantitativen Anteil einer Eiweißfraktion in den Proben verschiedener Stämme von der Genauigkeit der Proteinbestimmung ab. Wenn im Abschnitt "Ergebnisse" von hohen oder starken Banden gesprochen wird, ist dies nur in Relation zu den anderen Fraktionen desselben Stammes zu verstehen. Aus diesem Grund können derzeit auch an Banden, die im Gel bzw. Pherogramm nur schwach auftreten, noch keine Aussagen geknüpft werden. Eine Eiweißfraktion, die bei dem einen Stamm als schwache Bande erscheint, kann auch bei einem anderen Stamm vorhanden sein ohne jedoch wahrnehmbar zu werden, da hier möglicherweise weniger Protein aufgetragen wurde. Trotz dieser Einschränkung kann gesagt werden, daß Eiweiße mit derselben Wanderungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Stämmen in unterschiedlich hohem Anteil an der Proteinzusammensetzung des Organismus beteiligt sind. Diese Feststellung wurde durch die in dieser Arbeit erstmalig angewandte R - Wert Berechnung von Mykoplasmenbanden im PAA - Gel ermöglicht. Ohne Objektivierung der Bandenposition durch Bestimmung der relativen Wanderungsgeschwindigkeit ist eine diesbezügliche Aussage nicht möglich, da es, zumindest mit der hier angewandten Methode, nicht zu erreichen ist, Gele von so exakt gleichen Eigenschaften zu gießen, daß ein und dasselbe Eiweiß immer an der genau gleichen Stelle des Gelsäulchens liegt und durch einfaches Nebeneinanderstellen der Pherogramme ein Ver-

leich anhand der absoluten Wanderungsgeschwindigkeit durchzuführen ist.

Die Referenzbande, die als Anhaltspunkt für die R - Wert Berechnung diente, wurde während der Vorversuche zufällig gefunden. Sie war bei allen Stämmen mit Ausnahme des *A. laidlawii* deutlich ausgeprägt. Bei WS 7 und der Gruppe 2 traten im Bereich, in welchem diese Bande zu erwarten war, zwei fast gleichhohe Zacken auf. Es wurde die vom Nullpunkt weiter entfernte und etwas höher erscheinende Zacke als Referenzbande genommen. Dies erscheint dadurch gerechtfertigt, daß durch eine derartige Berechnung die R - Werte der anderen Fraktionen mit denen von Stämmen mit einer eingipfeligen Referenzbande übereinstimmten. Das Benützen einer bestimmten Bande zur Ermittlung der relativen Wanderungsgeschwindigkeit hat den Nachteil, daß bei Nichtvorhandensein der Bande die R - Wert Berechnung eventuell unmöglich wird. THEODORE et al. (1970) bilden in ihrer veröffentlichten Untersuchung von 18 Mykoplasmen - Spezies aus den verschiedensten Tierarten im PAA - Gel Pherogramme ab, die alle außer *M. iners*, *M. spumans* und *A. laidlawii* A und B eine Bande zeigen, die der bewußten Referenzbande entsprechen könnte. Da jedoch keine R - Wertbestimmung durchgeführt wurde und sich die publizierten Kurvenbilder nicht für eine diesbezügliche Untersuchung eignen, kann hier nichts Näheres darüber ausgesagt werden. Wenn die beschriebene Referenzbande fehlt, kann versucht werden, eine andere Bande zu finden, die auf Grund ihrer Lage im Gel und ihrer Deutlichkeit angesprochen werden und als Bestimmungsgrundlage dienen kann.

Lag ein Stamm als Reinkultur vor und zeigte er gutes Wachstum in Broth, so konnte er, abgesehen von den Isolaten der Gruppen 9 und 1c, innerhalb von 10 Tagen identifiziert werden. Es können noch 2 Tage eingespart werden, wenn die Entfernung der nicht gebundenen Farbe aus den Gelen statt durch Auswaschen elektrophoretisch durchgeführt wird. Die gute Reproduzierbarkeit der Methode und die Unabhängigkeit von Gegebenheiten im Wachstumsmedium der Mykoplasmen, wie sie RAZIN und ROTTEM (1967) und THEODORE et al. (1969) feststellten, fand auch bei dieser abgewandelten Untersuchungsmethode ihre Bestätigung.

Als einen weiteren Vorteil der Identifizierung von Mikroorganismen im PAA - Gel betonen RAZIN und ROTTEM (1967), daß diese Methode auch an frischen Isolaten aus klinischem Material anwendbar ist. Dies ist im Hinblick auf eine schnelle Diagnose von besonderer Wichtigkeit. Tritt in einer Geflügelpopulation eine **Erkrankung** auf, bei der Mykoplasmen isoliert werden, so kann deren Rolle im Krankheitsgeschehen erst nach der Speziesbestimmung geklärt werden. Sie bildet die Grundlage für etwa wahrzunehmende weitere Maßnahmen.

Es zeigte sich bei den Untersuchungen im PAA - Gel, daß auch Isoaltes, die nur einige Passagen in vitro durchlaufen hatten, fast immer anzusprechen waren. Mit herkömmlichen Methoden ist eine gleichschnelle Diagnose nicht mit Sicherheit möglich.

Bei der Bewertung der elektrophoretischen Untersuchungsergebnisse stellt das Auftreten bzw. Fehlen von Banden bei Stämmen gleicher Spezieszugehörigkeit ein Problem dar. In der Literatur sind diesbezüglich nur spärliche Angaben

vorhanden. RAZIN (1968) stellt Bandenunterschiede zwischen den *M. gallinarum* - Referenzstämmen I und PG 16 fest. In derselben Arbeit werden jedoch die Banden der *M. gallisepticum* - Stämme A 5969, S₆ und PG 31 als identisch bezeichnet, während RAZIN und ROTTEM (1967) vom Fehlen einer Bande beim Stamm A 5969 im Gegensatz zu S₆ und PG 31 berichten. *M. meleagridis*, *M. synoviae* und *M. iners* weisen nach diesen Autoren deutliche Unterschiede untereinander und zu *M. gallisepticum* auf. Worin diese Unterschiede genau liegen, wird von ihnen ebensowenig wie von THEODORE et al. (1970) dargelegt. Die eigenen Ergebnisse zeigen, daß die durch die Berechnung der R - Werte definierten Banden innerhalb keiner Spezies völlig identisch sind. Dies ist bei der großen Variabilität der Mikroorganismen auch nicht zu erwarten. Andererseits muß aber eine Spezies bestimmte, konstant vorhandene Merkmale auch in der Eiweißstruktur zeigen, die in diesen Untersuchungen aus Tabelle 3 und aus den Abbildungen zu ersehen sind. Das Fehlen einer, als spezifisch vermuteten Bande, wie z.B. R - 58,0 beim Stamm 459/70 kann allein wohl nicht die Zugehörigkeit zu einer Spezies ausschließen. Das Auftreten von Banden an Stellen, an denen keine Bande zu erwarten ist, muß ähnlich bewertet werden; z.B. R - 58,0 und R - 82,6 bei *M. anatis* 1340 und R - 44,3 bei 651/70.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchung wird eine auffallende, starke Bande mit der absoluten Wanderungsgeschwindigkeit von etwa 6 cm im hier verwendeten Gelsystem als mykoplasmaspezifisch angesehen. Da das Genus *Acholeplasma* nur in einem Stamm untersucht wurde, kann nicht entschieden werden, ob die sehr verschiedene Ausprägung dieser Bande bei beiden Genera stets zur Unterscheidung herangezogen werden kann. Die Einordnung der Feldstämme

erfolgte durch den Vergleich mit Referenzstämmen, wobei sich neben dem Kurvenbild 7 Banden (20,4, 44,3, 51,1, 58,0, 73,6, 82,6, 96,8) durch ihr konstantes Auftreten oder Fehlen innerhalb der verschiedenen Spezies als Unterscheidungsmerkmale anboten. Die restlichen 35 aufgetrennten Eiweißfraktionen konnten wegen ihrer starken Variabilität zwischen den Spezies nicht als Stammesmerkmale angesehen werden.

Die hier durchgeführte Versuchsanordnung erlaubt es nicht, Beziehungen zwischen Antigenstrukturen und bestimmten Eiweißfraktionen aufzuzeigen, obwohl derartige Beziehungen zu erwarten sind. Die bei den Stämmen festgestellten biochemischen und pathogenetischen Eigenschaften ließen sich ebenfalls nicht mit dem Auftreten oder Fehlen bestimmter Banden korrelieren.

Diskrepanzen zwischen der elektrophoretischen Untersuchungsmethode und der üblichen Differenzierung traten bei der Zuordnung zur Spezies *M. gallisepticum* auf. Die Stämme 366/70, 1199/70 und 1037/69 waren TTC - negativ, 366/70 auch Kohlehydrat negativ und agglutinierten nicht mit dem Referenz - Antiserum, gehörten nach der Elektrophorese jedoch zum Serotyp A. Die TTC - Reduktion ist nach den Erfahrungen am hiesigen Institut eine sehr empfindliche Reaktion, die nur bei gut adaptierten Stämmen und nur bei entsprechender Lagerung der sehr lichtempfindlichen Substanzen gelingt. Wenn trotz mehrmaliger Wiederholung der TTC - Test negativ bleibt, so muß diese Aussage vorsichtig bewertet werden. Nach den bisherigen Erfahrungen gilt eine solche vorsichtige Bewertung jedoch nicht für den Kohlehydrat - Abbau, der bei 366/70 nicht nachweisbar war. Das Nichtauftreten der Serumagglutination spricht

für die Zuordnung zur Gruppe 8 in Tabelle 1. Da die Stämme jedoch das für *M. gallisepticum* als typisch angesehene Bild zeigen, kann nur durch eine weitere Untersuchung geklärt werden, welche Kriterien für die Einordnung die entscheidenderen sind. Mit der Elektrophorese läßt sich eine weitere Gruppe unterscheiden, die jedoch vom Bild der Referenzstämmen abweicht. Die Gruppe 1 c mit den Stämmen 316/4/70 und 486/67 zeigt nicht die für *M. gallisepticum* als typisch angesehene Bandenfolge 73,6, 77,1, 82,6, hat aber mehrere charakteristische Banden (Tabelle 3) mit dieser Spezies gemeinsam. Das Kurvenbild weicht auch nicht erheblich von dem des Serotyps A ab. Es könnte sich also um einen Subtyp von *M. gallisepticum* handeln.

Die 5 Putenstämmen, die vermutlich zum Serotyp I gehören, zeigten bei der retrospektiven, anamnestischen Durchsicht der Befunde aus den Herkunftsbeständen einige Besonderheiten, die ebenfalls ihre Zugehörigkeit zu *M. gallisepticum* bezweifeln lassen. Bei den erkrankten Tieren trat in keinem Fall Sinusitis auf. Die Affinität zum Sinus ist offensichtlich geringer als bei *M. gallisepticum*. Die serologische Untersuchung ergab nur in Einzelfällen einen positiven Titer gegen *M. gallisepticum* - Antigen. Da die Herden nicht *M. gallisepticum* frei waren, kann dieser Befund auch Zeichen einer Kreuzantigenität zwischen *M. gallisepticum* und den Putenstämmen sein, wie sie z.B. zwischen *M. synoviae* und *M. gallisepticum*, sowie zwischen Serotyp P und *M. gallisepticum* besteht (ADLER und DA MASSA, 1965; OLSON, 1965; ROBERTS und OLESIUKE, 1967). Nach FABRIKANT (1969) sind die biochemischen Reaktionen der Stämme von Gruppe 2 mit denen von Serotyp I identisch. Das Vorliegen von Serotyp I kann daher ohne Kreuzantigenitätstest noch nicht als endgültig bewiesen gelten. Die Stämme der Gruppe 2 geben aber

einen sehr eindeutigen Hinweis darauf, daß bei genauer Bewertung eine sehr viel differenziertere Aufschlüsselung mit der PAA-G-E möglich ist, als mit dem herkömmlichen Schema. Sie erscheint wesentlich sicherer als die Serologie, die wegen häufig vorhandener Kreuzantigenität zu Irrtümern Anlaß geben kann.

Der WS 7 Stamm, der in der Literatur widersprüchlich teils als *M. gallisepticum* und teils nicht als solcher bezeichnet wird (EDE, 1969; ROBERTS, 1969), erwies sich auch bei der elektrophoretischen Untersuchung als nicht zu dieser Spezies gehörig (Tab. 3, Abb.6).

BARBER und FABRIKANT (1971) berichten über antigene Verwandtschaft zwischen *M. gallinarum* und *M. anatis*. KENNY (1971) widerspricht auf Grund seiner Immunodiffusionsversuche den Ergebnissen dieser Autoren. Bei der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich die Spezies eindeutig, was das Vorliegen antigener Beziehungen jedoch nicht ausschließt. *M. anatis* unterscheidet sich aber auch bezüglich seiner Pathogenität für Eintagsenten von *M. gallinarum*. Abweichende Angaben in der Literatur über die Pathogenität des *M. anatis* - Stammes von ROBERTS dürften überwiegend auf der Verwendung von älteren Tieren zu Übertragungsversuchen beruhen. Auch die Zeitspanne zwischen Inokulation und pathologisch - anatomischer Untersuchung des Versuchstieres kann eine Rolle spielen, da bei der Monoinfektion lokale Läsionen bereits nach 24 Stunden auftreten und, bei Ausbleiben einer Sekundärinfektion, die Heilung nach ca. 3 Wochen abgeschlossen ist (GERLACH, 1971). Die Feststellung, daß die *M. anatis* - Stämme im vorliegenden Versuch enten-

pathogen sind, steht deshalb nicht absolut im Widerspruch zur Literatur.

Die Familie Acholeplasmataceae war nur in dem einen Referenzstamm H3P10 vertreten und es konnten auch keine Feldisolate zugeordnet werden. Es wäre interessant, weitere Vertreter der Familie zu untersuchen, denn das Fehlen einer deutlichen Referenzbande könnte bedeuten, daß dieses Eiweiß als taxonomische Differenz zwischen Mykoplasma und Acholeplasma zu werten ist.

Die Gruppe 9 setzt sich aus 5 Stämmen zusammen, die anhand der vorgenommenen Untersuchungen nicht einzuordnen waren. Da in der vorliegenden Arbeit nicht alle Serotypen bzw. Spezies, die beim Geflügel in Form von Referenzstämmen vorkommen, zur Verfügung standen, ist es denkbar, daß auch diese Isolate bei entsprechenden Untersuchungen zu differenzieren sind. Möglicherweise handelt es sich auch um Stämme, die bisher noch nicht beschrieben wurden.

Die Untersuchung aviärer Mykoplasmen in der Polyacryl - amidgel - Elektrophorese hat sich bei entsprechender Auswertung als schnelle, gut reproduzierbare und hoch empfindliche Methode zur Speziesdifferenzierung erwiesen. Die mit dem herkömmlichen Differenzierungsschema als *M. gallisepticum* angesprochenen Stämme sind nach dem Ergebnis dieser Untersuchung keine einheitliche Gruppe. Es muß weiteren Untersuchungen überlassen bleiben abzuklären, inwieweit es sich bei diesen Untergruppen um taxonomisch echte Subtypen handelt, oder ob sich eine Neudefinierung der Spezies *M. gallisepticum* als notwendig erweist.

ZUSAMMENFASSUNG

Aviäre Mykoplasmen verschiedener Spezies und Serotypen - 14 Referenzstämme und 31 Feldisolate - wurden mit der Polyacrylamidgel - Elektrophorese untersucht. Objektiv verwertbare Ergebnisse wurden dadurch erzielt, daß die relative Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Eiweißfraktionen mit Hilfe einer auffälligen, als Referenzbande bezeichnete Zacke, berechnet wurde. Die Referenzstämme zeigten im Elektropherogramm spezifische Eigenschaften in Bezug auf das Kurvenbild und Vorhandensein bzw. Fehlen verschiedener Banden, die für die Differenzierung der Feldisolate und deren Zuordnung zu bestimmten Spezies oder Serotypen benutzt werden konnten. Beim Vergleich der Ergebnisse mit den Befunden der morphologischen, biochemischen, serologischen und pathogenetischen Untersuchung traten Diskrepanzen nur bei der Spezies *M. gallisepticum* auf, Diese konnten nicht restlos geklärt werden. Auf Grund der elektrophoretischen Ergebnisse ist anzunehmen, daß *M. gallisepticum* keine ganz einheitliche Stammgruppe darstellt. Die Zugehörigkeit zu dieser Spezies wird bei insgesamt 5 von 13 Feldstämmen in Frage gestellt. Durch die Auftrennung der Eiweißfraktionen gelang es, einen bisher in Deutschland nicht festgestellten Typ von *M. gallisepticum* abzutrennen. Vermutlich handelt es sich hier um Serotyp I.

Die Elektrophorese in der vorliegenden Form ist nicht zuletzt wegen ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit und ihrer guten Reproduzierbarkeit eine brauchbare Methode zur Identifizierung der aviären Mykoplasmen - Spezies. Sie erscheint sicherer als die serologische Differenzierung und bietet die Möglichkeit weitere Stammesunterschiede zu erkennen.

S U M M A R Y

Avian Mycoplasma of different species and serotypes - 14 reference strains and 31 field isolates - were examined with the Polyacrylamide gel electrophoresis. Objective usable results were thus attained by calculating the relative migrating speed of the individual protein fractions with the aid of an eye catching peak used as a reference feature. The reference strains showed specific properties in their electrophorogram referring to the curve pattern and to the presence or absence of different bands. With the aid of these specific properties of the reference strains it was possible to differentiate the field isolates and classify them into certain species and serotypes. Comparing the findings with the results of the morphological, biochemical, serological and pathogenic examination there were only discrepancies with the species of *M. gallisepticum*. These discrepancies could not be entirely explained. On the basis of the electrophoretical results it is assumed, that *M. gallisepticum* represents no uniform strain group. With 5 from 13 field-strains the relationship to this species is questionable. By separating the protein fractions it was possible to differentiate a type from *M. gallisepticum* which was not identified in Germany until now. It probably refers to serotype I.

The electrophoresis presented is due to the simple and rapid performance and good reproduction a suitable method to identify avian Mycoplasma species.

This method appears to be more reliable than the serological differentiation and it offers a possibility to distinguish further differences of strains.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ADLER, H.E., R. YAMAMOTO and R.A. BANKOWSKY :
A preliminary report of efficiency
of various mediums for isolation of
PPLO from exsudate of birds with CRD
Amer. J. Vet. Res. 15, 463 (1954)
- ADLER, H.E. : A PPLO slide agglutination test for
the detection of infectious sinusitis
of turkeys
Poultry Sci. 37, 1118 (1958)
- ADLER, H.E., A.J. DA MASSA and W.W. SADLER :
Application of the antiglobulin technique
for the detection of Mycoplasma galli-
septicum antibodies
Avian Dis. 8, 576 (1964)
- ADLER, H.E. and A.J. DA MASSA : Antigenicity of six
isolates of Mycoplasma gallisepticum
Avian Dis. 9, 205 (1965)
- BAHARSEFAT, H. and H.E. ADLER : Hemagglutination and
hemagglutination-inhibition test
with killed Mycoplasma antigen
Avian Dis. 9, 566 (1965)
- BAK, A.L. and F.T. BLACK : DNA base composition of
human T-strain Mycoplasmas
Nature 219, 1044 (1968)

- BARBER, T.L. and J. FABRIKANT : A suggested reclassification of avian Mycoplasma serotypes
Avian Dis. 15, 125 (1971)
- BARILE, M.F., W.F. MALIZIA and D.B. RIGGS : Immuno-fluorescence of PPLO in tissue cultures
Bact. Proc. 83, (1961)
- BARILE, M.F., W.F. MALIZIA and D.B. RIGGS : Incidence and detection of pleuropneumonia-like organisms in cell cultures by fluorescent antibody and cultural procedures
J. Bact. 84, 130 (1962)
- BAUDITZ, R. und K.H. HINZ : Vergleichende Untersuchungen zum fluoreszenzserologischen Nachweis von Mycoplasma gallisepticum unter Einbeziehung der Objektträgerkultur
D T W 75, 83 (1968)
- BENSON, H.N., H.S. BRUMFIELD and B.S. POMEROY : Requirement of avian C1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes
J. Immunol. 87, 616 (1961)
- BOX, P.G. : The liability of agglutinating antibodies in sera
Nat. Poultry Conf. on Mycoplasmosis
Kesteven Agriculture College (1968)

- BRÜCKLER, J. und H. BLOBEL : Vertikale Polyacrylamid-
gel - Disc - Elektrophorese von
Staphylokokken-Proteinen
Zentralblatt für Bakteriologie, Para-
sitenkunde, Infektionskrankheiten und
Hygiene I Orig. 213, 161 (1970)
- BRUMFIELD, H.S. and B.S. POMEROY zitiert nach:
R.A. BANKOWSKY, T. MIKAMI, and T. KINJO
Susceptibility of young Leghorn chickens
to an Ornithosis agent isolated from
turkeys
J. Inf. Dis. 117, 162 (1967)
- BUSINEILL, I.D. and C.B. HUDSON : Complement fixation
and agglutination test for Salmonella
pullorum infection
J. Inf. Dis. 48, 388 (1927)
- CAMPBELL, A.D. and A.W. TURNER : Complement fixation
reaction
Bull.Council Sci. Res. Aust. 97, 11 (1936)
- CHANOCK, R.M., M.A. MUFSON, N.L. SOMERSON and R.B. COUCH:
Role of Mycoplasma (PPLO) in human
respiratory disease
Amer. Rev. Resp. Dis. 88, 218 (1963)
- CHU, H.P. and R.W. HORNE : Electron microscopy of
Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma
mycoides, using the negative staining
technique and their comparison with
myxoviruses
Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 190 (1967)

- CLYDE, W.A. Jr. : Mycoplasma species identification
based upon growth inhibition by
specific antisera
J. Immunol. 92, 958 (1964)
- CORSTVET, R.E. : A comparative study of single and
multiple infections in the chicken
Ph. D. Thesis, Davis, California (1965)
- CORSTVET, R.E. and W.W. SADLER : A comparative study
of single and multiple respiratory
infections in the chickens
Poultry Sci. 44, 1361 (1965)
- CRAWLEY, J.F. and J.E. FAHEY : A proposed plan for
the control of chronic respiratory
disease in chickens
Poultry Sci. 34, 707 (1955)
- DAVIS, B.J. : Disc-electrophoresis.II. method and
application to human serum proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)
- DIERKS, R.E., J.A. NEWMAN and B.S. POMEROY :
Characterisation of avian Mycoplasma
Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 170 (1967)
- DOMERMUTH, C.M., M.H. NIELSEN, E.A. FREUNDT and
A. BIRCH-ANDERSON : Ultrastructure
of Mycoplasma species
J. Bact. 88, 727 (1964)
- EDE, B.L. : A strain of Mycoplasma gallisepticum
previously unreported in this country
Vet. Rec. 85, 293 (1969)

- EDWARD, D.G. and W.A. FITZGERALD : Inhibition of
growth of pleuropneumonia-like organisms
by antibody
J. Path. and Bact. 68, 23 (1954)
- EDWARD, D.G. and E.A. FREUNDT : Classification of
the Mycoplasmatales
In: L. HAYFLICK, The Mycoplasmatales
and the L-phase of bacteria
North Holland Publishing Company (1969)
- EDWARD, D.G. and E.A. FREUNDT : Amended nomenclature
for strains related to Mycoplasma
laidlawii
J. Gen. Microbiol. 62, 1 (1970)
- FABRIKANT, J. : Serological studies of avian pleuro-
pneumonia like organisms (PPLO) with
Edwards technique
Avian Dis. 4, 505 (1960)
- FABRIKANT, J. : Avian Mycoplasmas
In L. HAYFLICK, The Mycoplasmatales
and the L-phase of bacteria
North Holland Publishing Company (1969)
- FABRIKANT, J. : The occurrence, characteristics and
potential pathogenicity of serotype I
avian Mycoplasmas
Proc. 11th Poultry Pathologist Conf. (1970)
- FAHEY, J.E. and J.F. CRAWLEY : Studies on chronic
respiratory disease of chickens.
A hemagglutination inhibition diagnostic
test
Canadian J. Comp. Med. 18, 264 (1954)

FOWLER, R.C., D.W. COBLE, N.C. KRAMER and T.Mc.P. BROWN:
Starch gel electrophoresis of a
fraction of certain of the pleuro-
pneumonia like group of microorganisms
J. Bact. 86, 1145 (1963)

FOWLER, R.C., D.W. COBLE, N.C. KRAMER, R.R. PAI,
B.A. SERRANO and T.Mc.P. BROWN :
Immunoelectrophoretic analysis of
an aqueous fraction of some Mycoplasmata
and bacterial L-forms
Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 641 (1967)

FRIEDRICH, H. : Zur Anwendung des Stoffwechselhemm-
testes (MJ-Test) bei Mycoplasma galli-
septicum
Inaugural-Dissertation, Universität
München (1970)

GERLACH, H., R. YAMAMOTO und H.E. ORTMAYER : Zur
Pathologie der Phallus-Infektion der
Puten mit Mycoplasma meleagridis
Archiv für Geflügelkunde 32, 396 (1968)

GERLACH, H. : Factors of pathogenicity of avian
Mycoplasmas
Symposium d. Dtsch. Ges. f. Hygiene
u. Mikrobiologie, Mainz (1971)
Abstract in Zeitschr. f. Med. Mikro-
biologie u. Immunologie (im Druck)

GLICK, B. : Serum protein electrophoresis patterns
in acrylamid-gel: Patterns from normal
and bursaless birds
Poultry Sci. 47, 807 (1967)

GRAYSTONE, J.T., E.R. ALEXANDER, G.E. KENNY, E.R. CLARKE,
J.C. FREMONT and W.A. MAC COLL :

Mycoplasma pneumonia infections: Clinical
and epidemiological studies

J. Amer. Med. Ass. 191, 97 (1965)

HAYFLICK, L. : The Mycoplasmatales and the L-phase
of bacteria

North Holland Publishing Company (1969)

JANSSON, E., O. WAGER, R. STENSTRÖM, E. KLEMOLA and
P. FORSSELL :

Studies on Eaton PPLO-pneumonia

Brit. Med. J. 1, 142 (1964)

JUNGHERR, E.L., R.E. LUGINBUHL, M. TOURTELLOTTE and
W.E. BURR : Significance of serological
testing for chronic respiratory disease

Proc. Book Amer. Vet. Med. Ass. 315 (1955)

KELTON, W.H. and H. VAN ROEKEL : Serological studies
of Mycoplasma (PPLO) of avian origin

Avian Dis. 7, 272 (1963)

KELTON, W.H. and M. MANDEL : Deoxyribonucleic acid
base composition of Mycoplasma strains
of avian origin

J. Gen. Microbiol. 56, 131 (1969)

KENNY, G.E. : Serological taxonomy of the Mycoplasma-
tales

Symposium d. Dtsch. Ges. f. Hygiene u.
Mikrobiologie, Mainz (1971)

Abstract in Zeitschr. f. Med. Mikrobiolo-
gie u. Immunologie (im Druck)

- KING, J.R., T.S. THEODORE and R.M. COLE : Generic identification of L-forms by polyacrylamid-gel-electrophoretic comparison of extracts from parent strains and their derived L-forms
J. Bact. 100, 71 (1969)
- KIRK, R.G. and H.J. MOROWITZ : Ribonucleic acids of Mycoplasma gallisepticum strain A 5969
Amer. J. Vet. Res. 21, 274 (1969)
- KLECKNER, A.L. : Serotypes of avian pleuropneumonia like organisms
Amer. J. Vet. Res. 21, 274 (1960)
- KLIENEBERGER, E. : Pleuropneumonia like organisms of diverse provenance: some results of an enquiry into methods of differentiation
J. Hyg. (Camb.) 38, 458 (1938)
- KLIENEBERGER-NOBEL, E. : Pleuropneumonia like organisms, (PPLO), Mycoplasmataceae
New York Academic Press (1962)
- LAWSON, K.F. and R.T. HERTLER : A report on the use of serum plate antigen for the detection of antibodies to Mycoplasma gallisepticum
Poultry Sci. 48, 295 (1969)
- LEMCKE, R.M. : A serological comparison of various species of Mycoplasma by an agar-gel-double-diffusion-technique
J. Gen. Microbiol. 38, 91 (1965)

- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL : Protein measurement with the Folin-phenol-reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- MALIZIA, W.F., M.F. BARILE and D.B. RIGGS : Immuno-fluorescence of pleuropneumonia like organisms isolated from tissue cell cultures
Nature 191, 190 (1961)
- MARQUARDT, W.W. and J.A. NEWMAN : A direct complement-fixation-test for detection of Mycoplasma antibodies in chicken embryos
Avian Dis. 15, 139 (1970)
- MAURER, R.H. : Disk - Elektrophorese
Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968)
- NOEL, J.K., H.M. DE VOLT and J.E. FABER : Identification of Mycoplasma gallisepticum in lesion tissue by immunofluorescence
Poultry Sci. 43, 145 (1964)
- OLSON, N.O., R. YAMAMOTO and H.E. ORTMAYER : Antigenic relationship between Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum
Amer. J. Vet. Res. 26, 195 (1965)
- PERT, I.M., R.E. ENGLE, K.R. WOODS and M.H. SCHLEISINGER : Preliminary studies on quantitative zone electrophoresis in starch gel
J. Lab. Clin. Med. 54, 572 (1959)

- POULIK, M.D. : Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffer
Nature 180, 1477 (1957)
- PURCELL, R.H., D. WONG, R.M. CHANOCK, D. TAYLOR⁺
ROBINSON, J. CHANCHOLA and J. VAL⁺
DESUSO : Significance of antibody
to Mycoplasma as measured by metabolic-
inhibition techniques
Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 664 (1967)
- RAYMOND, S. and L. WEINTRAUB : Acrylamide gel as
supporting medium for zone electro-
phoresis
Sci. 130, 711 (1959)
- RAZIN, S., M. ARGAMAN and J. AVIGAN : Chemical com-
position of mycoplasma cells and
membranes
J. Gen. Microbiol. 33, 477 (1963)
- RAZIN, S, and S. ROTTEM : Identification of Mycoplasma
and other microorganisms by poly-
acrylamide-gel-electrophoresis of cell
proteins
J. Bact. 94, 1807 (1967)
- RAZIN, S., B.J. COSENZA and M.E. TOURTELOTTE :
Filamentous growth of Mycoplasma
Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 66 (1967)
- RAZIN, S. : Mycoplasma taxonomy studied by
electrophoresis of cell proteins
J. Bact. 96, 687 (1968)

- RHOADES, K.R. : A hemagglutination-inhibition test for *Mycoplasma meleagridis* antibodies
Avian Dis. 13, 21 (1969)
- RICE, C.E. : Atypical behavior of certain avian antisera in complement fixation tests
Can. J. Comp. Med. 11, 236 (1947)
- RICE, C.E. : Studies in Pullorum disease. XII. Technique of the indirect complement fixation test for activity with *Salmonella pullorum* antigen
Can. J. Comp. Med. 12, 69 (1948)
- RICHTERICH, R. : Klinische Chemie (2. erweiterte Auflage)
Akademische Verlagsgesellschaft
Frankfurt (1968)
- ROBERTS, D.H. : The isolation of an Influenza A virus and an *Mycoplasma* associated with duck sinusitis
Vet. Rec. 76, 470 (1964)
- ROBERTS, D.H. and O.M. OLESIUK : Serological studies with *Mycoplasma synoviae*
Avian Dis. 11, 104 (1967)
- ROBERTS, D.H. : Serological response produced in chickens by three strains of *Mycoplasma gallisepticum*
J. Appl. Bact. 32, 395 (1969)
- ROTTEM, S. and S. RAZIN : Electrophoretic patterns of membrane proteins of *Mycoplasma*
J. Bact. 94, 359 (1967)

- SABRY, M.M. : Characterisation and classification
of avian Mycoplasma
Ph. D. Thesis, Cornell University (1968)
- SACKS, T.G., M. HAAS and S. RAZIN : Polyacrylamide-
gel electrophoresis of cell proteins
of enterobacteriaceae
Israel J. Med. Sci. 5, 49 (1969)
- SCHELLNER, H.P. : Blutbild, Hämatokrit und elektro-
phoretische Auftrennung im Polyacryl-
amidgel von Seren gesunder Brieftauben
B M T W 83, 235 (1970)
- SCHIMMEL, D. und TH. HUBRIG : Zur serologischen
Differenzierung von Mycoplasmen des
Schweines
Monatsh. Vet, Med., VEB G. Fischer
Jena 3, 89 (1968)
- SCHMITT, J. : Das Differenzieren tierischer Proteine
mit der vertikalen Polyacrylamidgel Ele-
ktrophorese
D T W 75, 87 (1968)
- SHIMIZU, A. and G. SATO : A study of Mycoplasma galli-
septicum by agar-gel double diffusion
technique
English summaries of the studies on
poultry disease in Japan 43 (1970)
- SMITHIES, O. : Zone electrophoresis in starch gels:
group variations in the serum proteins
of normal human adultes
Biochem. J. 61, 629 (1955)

- SMITHIES, O. : An improved method for starch gel electrophoresis
Biochem. J. 71, 585 (1959)
- SOMERSON, N.L. and S.M. WEISSMAN : Application of nucleic acid techniques to the study of Mycoplasma and L-phase organisms
In: L. HAYFLICK, The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria
North Holland Publishing Company (1969)
- STAINBRIDGE, E. and L. HAYFLICK : Growth inhibition test for identification of Mycoplasma species utilizing dried antiserum-impregnated paper discs
J. Bact. 93, 1392 (1967)
- TAKAYAMA, K., D.M. MAC LENNAN, A. TZAGOLOFF and C.D. STONER : Studies on the electron transfer system LXVII. Polyacrylamidegel electrophoresis of the mitochondrial electron transfer complexes
Arch. Biochem. Biophys. 114, 223 (1966)
- TAYLOR-ROBINSON, D., N.L. SOMERSON, H. TURNER and R.M. CHANOCK : Serological relationship among human Mycoplasmas as shown by complement fixation and gel diffusion
J. Bact. 85, 1261 (1963)
- TAYLOR-ROBINSON, D., O. SOBELAVSKY and R.M. CHANOCK : Relationship of Mycoplasma pneumoniae to other human Mycoplasma species, studied by gel diffusion
J. Bact. 90, 1432 (1965)

- THEODORE, S.T., J.R. KING and R.M. COLE : Identifi-
cation of L-forms by polyacrylamidegel
electrophoresis
J. Bact. 97, 495 (1969)
- THEODORE, S.T., J.R. KING, I.G. TULLY and R.M. COLE :
Polyacrylamide gel patterns of micro-
organisms
Development in Industrial Microbiologie
11, 121 (1970)
- WALKER, R.T. : DNA-homology of two Mycoplasma species
Nature 216, 711 (1967)
- YAMAMOTO, R. and H.E. ADLER : Characterisation of
pleuropneumonia-like organisms of
avian origin. 1. Antigenic analysis of
7 strains and their comparative pathoge-
nicity for birds
J. Inf. Dis. 102, 143 (1958)
- YAMAMOTO, R. and H.E. ORTMAYER : persönliche Mitteilung
(1971)
- YODER, H.W. and M.S. HOPSTAD : Characterisation of
avian Mycoplasmas
Avian Dis. 8, 481 (1964)
- ZOLLI, Z.Jr. and W.L. MUTH : Effect of Spectinomycin
on experimentally induced chronic
respiratory disease (Mycoplasma galli-
septicum) in chickens
J. Poultry Sci. Ass. 46, 1342 (1967)

Frau Professor Dr. I. Gylstorff bin ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Ebenso gebührt mein Dank Frau Dr. H. Gerlach und Herrn Dr. H.-P. Schellner für die mir entgegengebrachte Hilfe in allen Fragen.

Auch allen Institutsangehörigen möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft recht herzlich danken.

L E B E N S L A U F

Am 14. März 1944 wurde ich in Lauingen/Do. als Sohn des Buchhalters August Müllegger und seiner Ehefrau Margarete, geb. Becker, geboren.

Vom Herbst 1950 bis zum Herbst 1954 besuchte ich die Volksschule in Augsburg, anschließend bis 1964 das Realgymnasium Augsburg. Dort legte ich im Sommer 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1964/65 immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Die Veterinärpraktikantenzeit absolvierte ich bei Herrn Dr. H. Heinen in Wanlo. Am 28. Juni 1969 bestand ich die tierärztliche Prüfung und am 28. Juli 1969 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Von April 1970 bis Dezember 1971 war ich am Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels unter Leitung von Frau Prof. Dr. I. Gylstorff mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation beschäftigt.

